



เอนไซม์ไฮดรอกซีเมทิลกลูตาไรล โคเอนไซม์เอซินเทสในซี-ซีรัม
ของน้ำยางพารา

Hydroxymethyl Glutaryl Coenzyme A Synthase in C-serum from
Hevea brasiliensis Latex

นงเยาว์ เทพยา

Nongyao Tepaya

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biological Sciences

Prince of Songkla University

2542

Order Key 18613
BIB Key 190141

เลขหมู่ 0K899.13 8627 2542 ก. 2
เลขทะเบียน
- 1 28.8. 2542

ชื่อวิทยานิพนธ์

เอนไซม์ไฮดรอกซีเมทิลกลูตาริล โคเอนไซม์เอซิงเทส
ในซี-ซีรัมของน้ำยางพารา

ผู้เขียน

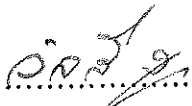
นางสาวนงเยาว์ เทพยา

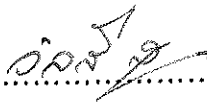
สาขาวิชา

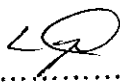
วิทยาศาสตร์ชีวภาพ


คณะกรรมการที่ปรึกษา

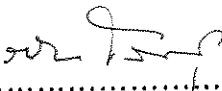
คณะกรรมการสอบ


.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วัลลภ สุวจิตตานนท์)

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วัลลภ สุวจิตตานนท์)


.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นงพร ไตวัฒนะ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นงพร ไตวัฒนะ)

.....กรรมการ
(ดร. รพีพร โสทธิพันธุ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สนั่น สุขชีรสกุล)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. ก้าน จันทร์พรหมมา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ เอนไซม์ไฮดรอกซีเมทิลกลูตาไรล โคอเอนไซม์เอซอินเทสในซี-ซีรัม
ของน้ำยางพารา
ผู้เขียน นางสาว นงเยาว์ เทพยา
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ
ปีการศึกษา 2541

บทคัดย่อ

เอนไซม์ hydroxymethylglutaryl coenzyme A synthase (HMG-CoA synthase) เร่งปฏิกิริยา การรวมตัวของ acetyl CoA และ acetoacetyl CoA เป็น hydroxymethylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) ซึ่งมีบทบาทในการสังเคราะห์ polyisoprene เอนไซม์ HMG-CoA synthase ส่วนใหญ่อยู่ในซี-ซีรัม ที่แยกได้จากการปั่นน้ำยางพาราเพื่อแยกเป็นชั้นของเนื้อยาง, ชั้นฟริวสลิ้ง, ชั้นของซี-ซีรัม และชั้นก้นหลอด เมื่อทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์ขึ้นโดยผ่านโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose และเจลฟิลเตรชันโดยใช้ Sephadex G-75 พบว่าสามารถกำจัดโปรตีนอื่นๆออกไปเพียงบางส่วน เอนไซม์ที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ (partially purified enzyme, PPE) ความบริสุทธิ์ของ PPE จะสูงกว่าเอนไซม์ในซี-ซีรัมประมาณ 5 เท่า เมื่อนำ PPE ไปแยกโปรตีนอื่นๆออกโดย เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบสภาพธรรมชาติ (native gel electrophoresis) และตรวจหาว่าเอนไซม์นี้อยู่ส่วนใดของเจลนี้ โดยการตัดเจลเป็นชิ้นๆ และวิเคราะห์หาความว่องไวของเอนไซม์ในแต่ละชิ้น สกัดเจลส่วนที่มีเอนไซม์ เพื่อนำไปศึกษาสมบัติของเอนไซม์ พบว่ามีค่า pI (isoelectric point) เท่ากับ 4.6 และมีน้ำหนักโมเลกุล 43,000 ดาลตัน นอกจากนี้ยังพบว่า L-659, 699 ที่ยับยั้งความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากแหล่งอื่นๆ ยับยั้งความว่องไวของเอนไซม์จากซี-ซีรัมของน้ำยางพาราได้ด้วย เมื่อนำเอนไซม์ที่แยกได้นี้ไปกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในกระต่าย เพื่อนำแอนติบอดีที่ได้ไปใช้ตรวจหาเอนไซม์ HMG-CoA synthase

โดยวิธี Western blot และ Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) พบว่า
สามารถนำไปใช้ได้ ใน Western blot ส่วน ELISA ยังคงต้องรอศึกษาต่อไปในอนาคต

Thesis Title Hydroxymethyl Glutaryl Coenzyme A Synthase in C-serum from
 Hevea brasiliensis Latex
Author Miss Nongyao Tepaya
Major Program Biological Sciences
Academic Year 1998

Abstract

HMG-CoA synthase catalyses the reaction of
 $\text{acetyl CoA} + \text{acetoacetyl CoA} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA} + \text{CoA}$
which involves the synthesis of polyisoprene in plant. In rubber latex, most of
the enzyme is found in C-serum. Purification of the enzyme in C-serum by
column chromatography using CM-cellulose and Sephadex G-75; specific activity
of the partially purified enzyme (PPE) was about 5 folds that of C-serum. PPE was
further purified by native polyacrylamide gel electrophoresis. The gel was cut into
small pieces of 1 mm-width, extracted and assayed for the enzyme activity. The
enzyme extracted from the gel with HMG-CoA synthase activity was used for
studying the enzyme properties. The purified HMG-CoA synthase enzyme has pI of
4.6 with molecular weight of 43,000 Dalton. L-659, 699 known to inhibit
HMG-CoA synthase from other sources can also inhibit HMG-CoA synthase
from C-serum of rubber latex. The enzyme extracted from the gel at the position
with HMG-CoA synthase activity was used for raising antibody in rabbits. The
antibody in the rabbit serum was used for detection of HMG-CoA synthase in
samples from rubber latex by Western blot and by Enzyme Linked Immunosorbent
Assay (ELISA). Detection of the enzyme using ELISA needs further investigation.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วลดี สุวจิตตานนท์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำปรึกษาแนวทางในการทำวิจัย การเขียนและการแก้ไขวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดีมาโดยตลอด ตลอดจนให้ความสะดวกในทุกๆด้าน ด้วยความเอาใจใส่อย่างยิ่ง ทำให้ผู้วิจัยได้รับความรู้ และเพิ่มพูนประสบการณ์อันเป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตามจุดประสงค์ที่ได้วางไว้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. นางพร โด้วฒนะ กรรมการที่ปรึกษา ร่วมที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องยิ่งขึ้น และขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. รพีพร โสทธิพันธุ์ กรรมการผู้แทนภาควิชาชีวเคมีและผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สนั่น สุภธีรสกุล กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบ และให้คำแนะนำการเขียน ตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณนवलพรรณ ศิริनुพงศ์ ที่ได้ให้ข้อมูลเกี่ยวกับการทำ Western blot และบริษัท Merck ที่ได้เอื้อเฟื้อ L-659, 699 ในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณเสาวลักษณ์ วิมุตติพงศ์ และเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมีทุกคน ตลอดจนผู้ให้คำแนะนำซึ่งไม่ได้กล่าวนาม ณ ที่นี้ด้วย ที่อำนวยความสะดวกเกี่ยวกับอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง และเป็นกำลังใจด้วยดีมาโดยตลอด จนทำให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลงด้วยความเรียบร้อย

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณกำลังใจที่สำคัญยิ่งจาก คุณพ่อ-คุณแม่, คุณเขาวเรศ เทพยา และ คุณ สิรรัตน์ เทพยา ที่คอยให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา ตลอดจนผู้มีพระคุณและคณาจารย์ผู้ประสิทธิ์ประสาทความรู้ให้แก่ผู้วิจัยจนได้มีโอกาสทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จ

นางเขาว์ เทพยา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(1)
Abstract	(3)
กิตติกรรมประกาศ	(4)
สารบัญ	(5)
รายการตาราง	(6)
รายการรูป	(7)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(10)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	5
วัตถุประสงค์	31
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	32
วัสดุ	32
อุปกรณ์	35
วิธีการ	36
3. ผลการทดลอง	58
4. วิจารณ์	83
5. สรุป	93
เอกสารอ้างอิง	95
ประวัติผู้เขียน	112

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. การแยกเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากซี-ซีรัมให้ บริสุทธิ์ขึ้นเริ่มต้นจากซี-ซีรัม 80 มิลลิลิตร และผ่านชั้น ตอนต่างๆตามลำดับ	59
2. ความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ค่อนข้าง บริสุทธิ์จากการสกัดเจลเมื่อ มีและไม่มี acetoacetyl CoA	73
3. ความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในซี-ซีรัม จากน้ำยางพารา, แอนติบอดีจากกระต่ายและสารละลาย ผสมของซี-ซีรัมจากน้ำยางพาราและแอนติบอดีจากกระต่าย	76

รายการรูป

รูปที่	หน้า
1. วิธีการสร้างยางจากอะซิเตท ในน้ำยาง (Lynen, 1969)	3
2. วิธีการสังเคราะห์คอเลสเทอรอลในสัตว์ (Brown <i>et al.</i> , 1980)	4
3. การเปลี่ยนแปลงของ Acetyl CoA ในไมโทคอนเดรียและไซโตพลาสซึม (McGarry <i>et al.</i> , 1969)	7
4. วิธีการเปลี่ยนแปลงของ HMG-CoA synthase ในพืช	8
5. การเก็บน้ำยางพาราจากต้นยางพารา	36
6. การแยกชั้นของน้ำยางพาราที่ผ่านการเซนตริฟิวจ์ด้วยเครื่องอุลตราเซนตริฟิวจ์ แรงเหวี่ยง 49,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที	37
7. ไดอะแกรมการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น	39
8. การทำเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากซี-ซีรัมให้บริสุทธิ์โดยโครโมโตกราฟีบนคอลัมน์ Sephadex G-75 ขนาด 1.5 x 21 cm โดยนำโปรตีนที่ผ่านการแยกด้วย CM-cellulose cation exchanger แล้วทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ CM-cellulose ชนิดผง จากนั้นนำไปแยกด้วย Sephadex G-75 ละโปรตีนในคอลัมน์ด้วย 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 ด้วยอัตราเร็ว 18 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารหลอกละ 2 มิลลิลิตร พบเอนไซม์ส่วนใหญ่ในพีคที่ 1	60
9. การข้อมโปรตีนและลักษณะการตัดเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแบบสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาบ้างแล้วจนถึงขั้นผ่าน Sephadex G-75	62

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
10.	แสดงการแยกโปรตีนด้วยประจุไฟฟ้าแบบ SDS-PAGE ของเอนไซม์ที่ได้จากขั้นตอนการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ต่างๆ 63
11.	การกระจายของเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากซี-ซีรัม ของน้ำยางพาราที่ผ่านการสกัดเจลใน SDS-PAGE อิเล็กโทรโฟเรซิส 64
12.	การเคลื่อนที่ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นในขั้นตอนการสกัดเจลจากอิเล็กโทรโฟเรซิส แบบสภาพธรรมชาติเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบค่า pI 66
13.	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) กับ ค่า \log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน 6 ตัว 67
14.	สเปกตรัมของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ได้จากการสกัดเจลอิเล็กโทร โฟเรซิสแบบสภาพธรรมชาติ 68
15.	อิทธิพลของ DMSO ต่อการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ได้จากเจลฟิลเตรชัน ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 55 ไมโครกรัม ในปฏิกิริยาที่มีปริมาตร 100 ไมโครลิตร 70
16.	อิทธิพลของ L-659, 699 ต่อความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในซี-ซีรัมจากน้ำยางพารา 10 ไมโครลิตร ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 38 ไมโครกรัม 71
17.	อิทธิพลของ L-659, 699 ต่อความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ได้จากเจลฟิลเตรชันที่ทำให้เข้มข้นซึ่งมีปริมาณโปรตีน 55 ไมโครกรัม 72
18.	แถบโปรตีนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาแบบจำเพาะระหว่าง แอนติเจน (เอนไซม์ HMG-CoA synthase) และแอนติบอดีของกระต่าย 75

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
19. แสดงการทำ Western blot เปรียบเทียบโปรตีนที่แยกได้บนแผ่น nitrocellulose ที่ย้อมด้วย Ponceau S (รูป ก) กับที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อเอนไซม์ HMG-CoA synthase (รูป ข)	77
20. ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ ซี-ซีรัม ที่มี เอนไซม์ HMG-CoA synthase กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ในการตรวจหาเอนไซม์โดย ELISA วิธีที่ 1 (การฉาบเพลทด้วยแอนติเจน) ซึ่งใช้แอนติบอดีตัวที่ 2	80
21. ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซี-ซีรัมที่มีเอนไซม์ HMG-CoA synthase กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ในการตรวจหาเอนไซม์ โดย ELISA วิธีที่ 2 (การฉาบเพลทด้วยแอนติบอดี)	81
22. ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซี-ซีรัม ที่มีเอนไซม์ HMG-CoA synthase กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ในการตรวจหาเอนไซม์ โดย ELISA วิธีที่ 3 (ฉาบเพลทด้วยสารละลายผสมระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี)	82

ตัวย่อและสัญลักษณ์

AACT	=	acetoacetyl CoA thiolase
BSA	=	bovine serum albumin
bp	=	base pair
$^{\circ}\text{C}$	=	degree Celsius
cm	=	centimetre
CM-cellulose	=	carboxy methyl-cellulose
CO_2	=	carbon dioxide
dpm	=	disintegration per minute
DEAE-cellulose	=	diethylaminoethyl cellulose
DMSO	=	dimethyl sulfoxide
DTT	=	dithiothreitol
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	=	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Fe^{2+}	=	ferrous ion
g	=	centrifugal force
HMG-CoA	=	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A
HMG-CoA synthase	=	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase
IC_{50}	=	inhibitor concentration at 50% inhibition
kb	=	kilobase
kDa	=	kiloDalton
K_m	=	Michaelis-Menten constant
mg	=	milligram
Mg^{2+}	=	magnesium ion

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

ml	=	millilitre
mmole	=	millimole
MW.	=	molecular weight
min	=	minute
nm	=	nanometre
nmole/min	=	nanomole per minute
N	=	normal
NaOH	=	sodium hydroxide
Native PAGE	=	native polyacrylamide gel electrophoresis
OD	=	optical density
PAGE	=	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	=	phosphate-buffered saline
pH	=	-log hydrogen ion concentration
pI	=	isoelectric point
POPOP	=	1,4 - bis [2 - (5 - phenyloxazoly)] benzene
PP	=	pyrophosphase
PPE	=	partially purified enzyme
PPO	=	2,5 - diphenyloxazole
R _f	=	relative mobility
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	=	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TBS	=	tris-buffer saline

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

TEMED	=	N,N,N',N' -tetramethyl ethylene diamine
Tris-HCl	=	Tris (hydroxy methyl aminomethane) hydrochloride
α	=	alpha
β	=	beta
μCi	=	microcuries
μl	=	microlitre
μM	=	micromolar
μmol	=	micromole
%	=	percent

1. บทนำ

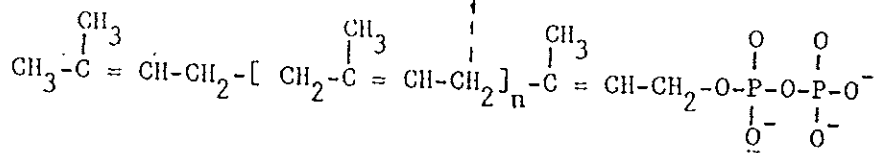
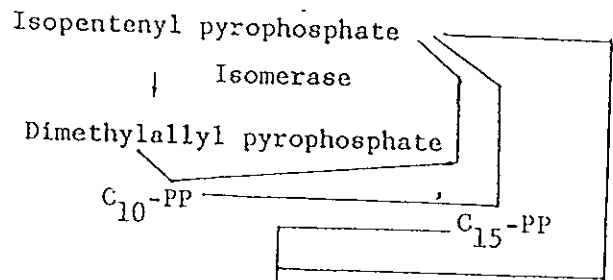
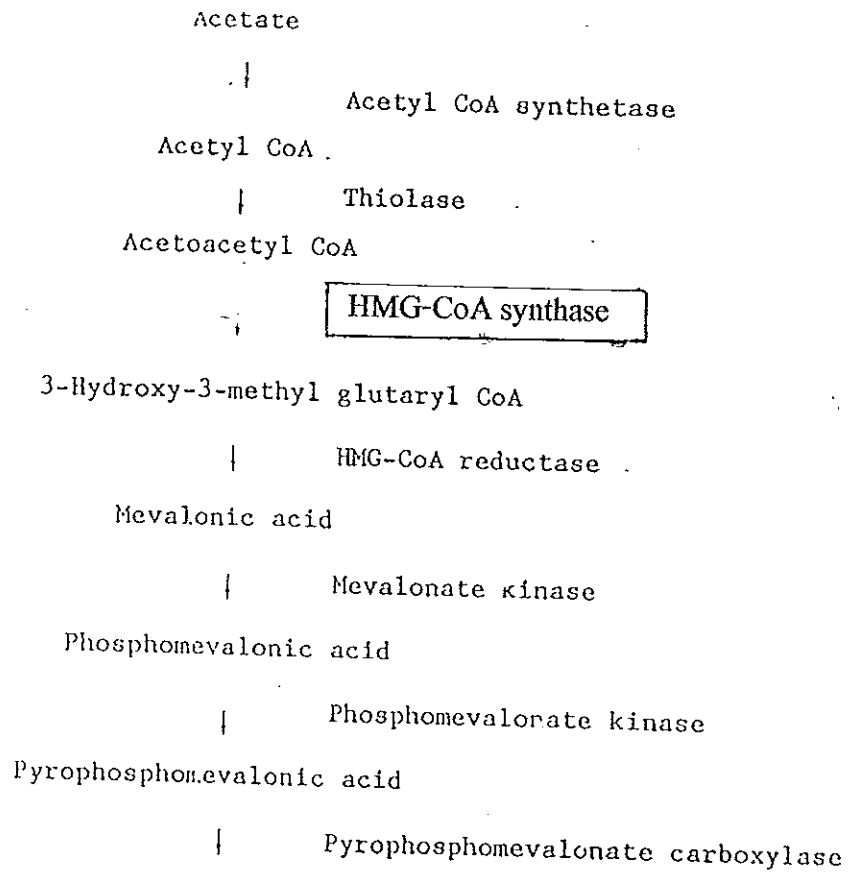
บทนำต้นเรื่อง

ยางพารา (*Hevea brasiliensis*) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของไทย ที่ให้ผลผลิตเพื่อการส่งออกในรูปแบบต่าง ๆ เช่น ยางแผ่นรมควัน, ยางแท่ง, น้ำยางข้น, ยางแผ่นผึ่งแห้ง, ยางเครพ ซึ่งทำรายได้นำเงินตราเข้าสู่ประเทศไทยได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับพืชเศรษฐกิจชนิดอื่น [ธนาคารกรุงเทพ จำกัด (มหาชน), 2540] เนื่องจากสภาพภูมิประเทศและภูมิอากาศที่เหมาะสมในการเพาะปลูกยางพารา ภาคใต้จึงเป็นภาคที่ได้ชื่อว่าเป็นตัวแทนหลักที่มีเกษตรกรเป็นจำนวนมาก มีอาชีพกรีดยาง และอาชีพนี้เป็นอาชีพหลักที่ทำให้เกษตรกรทางภาคใต้มีรายได้ที่มากและเพียงพอต่อการดำรงชีวิตประจำวัน นอกจากนี้ภาคใต้แล้ว ภาคตะวันออกของประเทศไทยและภาคตะวันออกเฉียงเหนือก็มีการปลูกยางพารากันมากขึ้นเช่นเดียวกัน โดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ทางสถาบันวิจัยยางกรมวิชาการเกษตรได้ขยายพื้นที่ปลูกยางพารามากขึ้นเพื่อที่จะกระจายการผลิต เพื่อให้โอกาสเกษตรกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีทางเลือกมากขึ้น (จิรากร และ สุจินต์, 2540) คำแนะนำพันธุ์ยางปี พ.ศ. 2540 โดยสถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตรแนะนำพันธุ์ยางชั้นที่ 1 ได้แก่ สงขลา 36, BPM 24, PB 255, PB 260, PR 25, RRIC 11 และ RRIM 600 เพราะให้ผลผลิตสูง (สถาบันวิจัยยาง, 2540) ซึ่งกว่าจะได้ข้อสรุปว่า ยางพันธุ์ใดให้ผลผลิตสูง และสมควรได้รับการส่งเสริมให้แพร่หลายนั้น ต้องใช้เวลาในการปรับปรุงพันธุ์ยางและตรวจสอบเป็นเวลานาน เนื่องจากต้นยางพาราเป็นพืชยืนต้น อายุการปลูกจนถึงอายุการกรีดยาวนาน ต้องใช้เวลาติดตามผลเป็นระยะเวลานานประมาณ 5-6 ปี

การแก้ปัญหาเรื่องระยะเวลาที่ใช้เพื่อหาข้อมูลที่จะสรุปให้ได้ว่ายางพันธุ์ใดเป็นยางพันธุ์ดี ให้ผลผลิตสูง สมควรส่งเสริมแนะนำให้เกษตรกรปลูก โดยไม่ต้องใช้เวลาคิดตามผลนานหลายปีนั้น ได้มีนักวิทยาศาสตร์ พยายามศึกษาค้นคว้าวิจัยใช้วิธีการต่างๆ เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการสังเคราะห์แสงกับลักษณะอื่นๆ

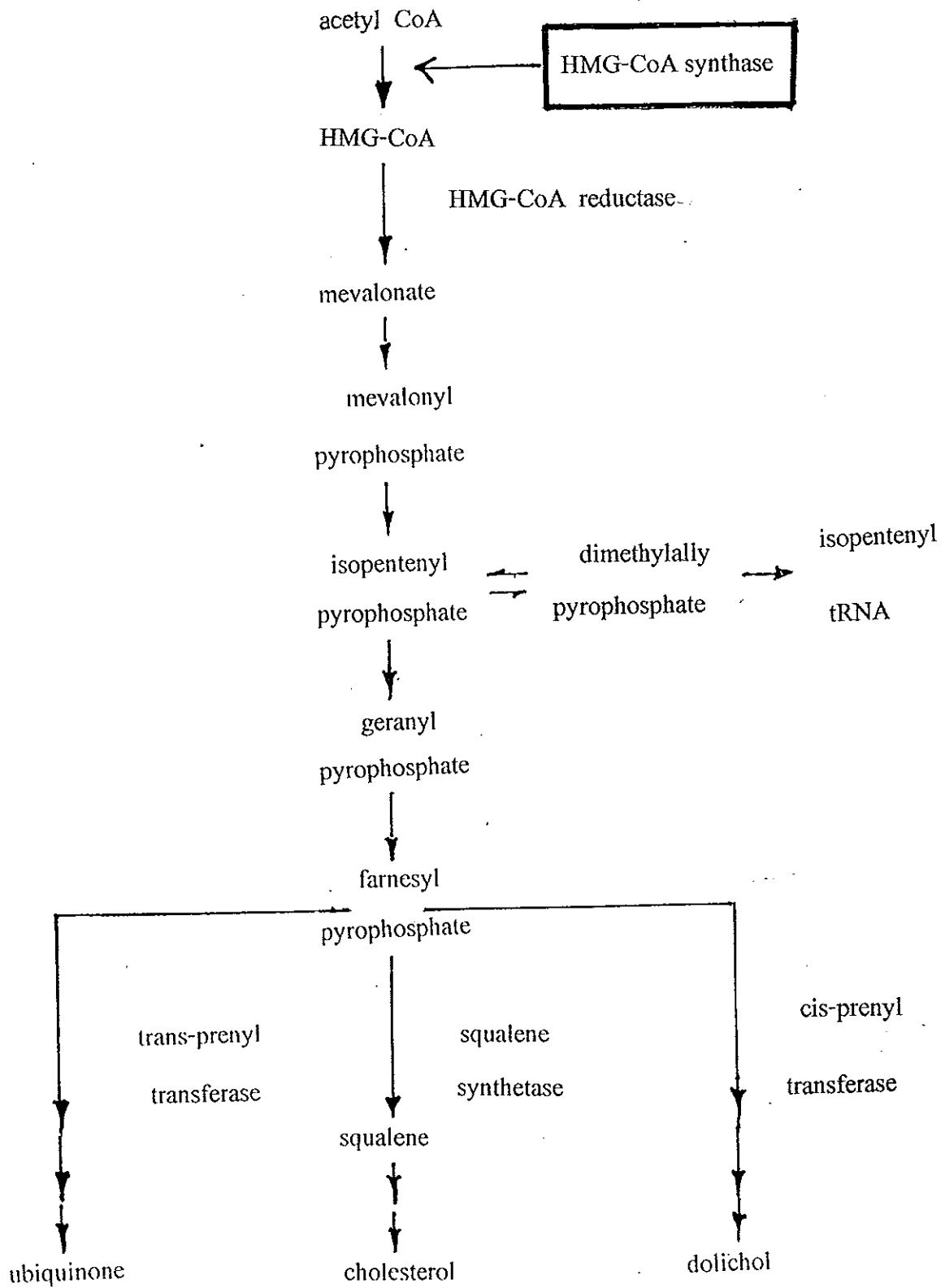
ที่อาจตรวจวัดได้ง่าย เช่น การศึกษาระดับของสารประกอบไคฮอล กับปริมาณเนื้อ
 ยาง (Suvachittanont *et al.*, 1986) หรือดูความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ HMG-CoA
 reductase กับปริมาณเนื้อยาง (Wititsuwanakul, 1986) การดูลักษณะการกระจาย
 ของโปรตีนในยางพาราพันธุ์ต่าง ๆ (วิจิตรา และ ผจญศักดิ์, 2527) รวมทั้งการรวม
 รวม สมบัติบางประการของยางพารา (อุตสาห์, 2527) แต่วิธีการเหล่านี้ ยังจำเป็นต้อง
 มีข้อมูลจากวิธีการอื่นๆมาประกอบอีก.

กระบวนการสังเคราะห์ยางของต้นยางพาราประกอบด้วยปฏิกิริยาที่มี
 เอนไซม์เป็นตัวเร่งอยู่หลายชนิดด้วยกัน ดังรูปที่ 1 แต่เอนไซม์ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกั
 การควบคุมการก่อผลผลิตเป็น โมเลกุลยางพาราที่สำคัญได้แก่ เอนไซม์ไฮดรอกซี
 เมทิลกลูตาไรลโคเอนไซม์เอซิมเทส (Hydroxymethylglutaryl coenzyme A synthase
 หรือ HMG-CoA synthase) และเอนไซม์ไฮดรอกซีเมทิลกลูตาไรลโคเอนไซม์เอร์ดิค
 เทส (Hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase หรือ HMG-CoA reductase)
 เอนไซม์ทั้งสองนี้ต่างมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โมเลกุลยางพาราในต้นยาง
 (Lynen, 1969) เช่นเดียวกับวิถีการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในสัตว์จาก Acetyl CoA
 ดังรูปที่ 2 ซึ่งมีการสังเคราะห์เป็น HMG-CoA โดยเอนไซม์ HMG-CoA synthase
 และ HMG-CoA reductase เปลี่ยน HMG-CoA เป็น mevalonate (Balasubramanian
et al., 1977) มีข้อมูลที่บ่งชี้ว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ ต่างก็มีบทบาทที่สำคัญในการควบ
 คุมการสังเคราะห์ยางพาราในต้นยาง จากการติดตามความว่องไวของเอนไซม์
 HMG-CoA reductase (Wititsuwanakul, 1986) และ HMG-CoA synthase
 (Suvachittanont and Wititsuwanakul, 1995) ในยางพารา ยังพบว่าเอนไซม์ทั้งสองนี้
 ต่างมีความสัมพันธ์กับปริมาณเนื้อยางพารา และเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในน้ำ
 ยางพารามีปริมาณมากกว่า HMG-CoA reductase ดังนั้นจึงอาจใช้การติดตามความว่อง
 ไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ว่ายางพันธุ์ใดเป็นยางพันธุ์ที่ดี
 ได้ด้วย หากทำให้เอนไซม์ HMG-CoA synthase มีความบริสุทธิ์ขึ้นแล้วนำเอนไซม์นี้
 ไปใช้ในการเตรียมแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง และนำมาใช้ตรวจสอบและวิเคราะห์หา
 ปริมาณเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ยางพารา
 โดยวิธี Western blot และ ELISA (Enzyme - Linked Immunosorbent Assay)



Cis 1,4 polyisoprene (C₅H₈)_n or ยาง

รูปที่ 1 วิธีการสร้างยางจากอะซิเตทในน้ำยาง (Lynen, 1969)



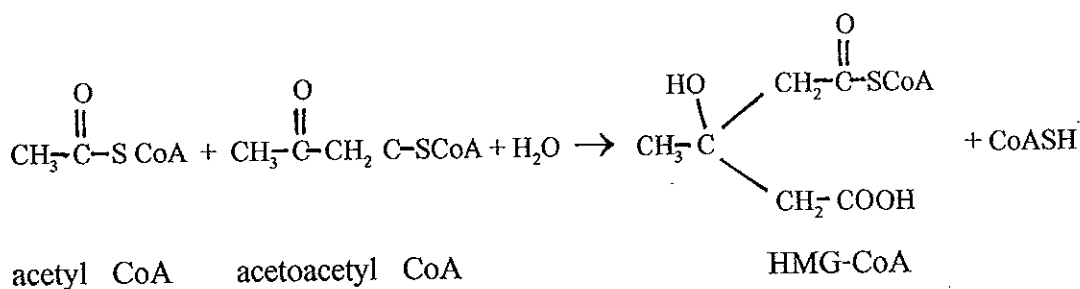
รูปที่ 2 วิธีการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในสัตว์ (Brown *et al.*, 1980)

(Engvall, 1980) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถตรวจหาสารชีวโมเลกุลที่มีปริมาณน้อยๆ ได้อย่างถูกต้อง อาจนำผลไปพิจารณาตรวจสอบและคัดเลือกพันธุ์ที่สามารถให้เนื้อ ยางพาราได้สูงต่อไป เมื่อปี 2539 สุรีย์ พิรุณติ ได้ทำการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้น พร้อมทั้ง ศึกษาสมบัติของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ได้ระดับหนึ่งพบว่าเอนไซม์ นี้เสถียรทางธรรมชาติได้ง่าย ยังมีอาจเตรียมเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ให้เพียงพอที่จะนำ ไปเตรียมแอนติบอดี จึงจำเป็นต้องหาสถานะการทดลองหรือทำการทดลองเพื่อให้ได้ เอนไซม์ปริมาณเพียงพอที่จะใช้ในการเตรียมแอนติบอดีต่อไป

การตรวจเอกสาร

1.1 เอนไซม์ HMG-CoA synthase

เอนไซม์ HMG-CoA synthase (3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - coenzyme A synthase) (E.C. 4.1.3.5) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาระหว่าง acetyl CoA และ acetoacetyl CoA ให้กลายเป็น 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) และ CoA ดังสมการ



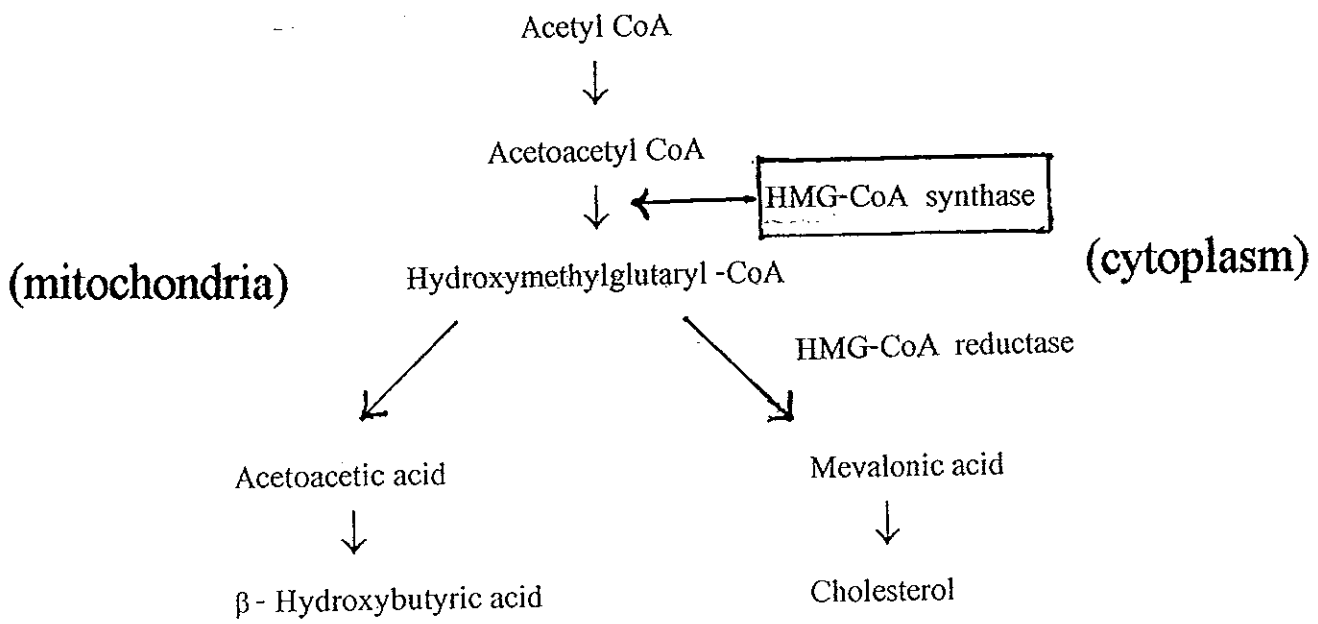
ในสัตว์ HMG-CoA ที่เกิดขึ้น สามารถเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้ 2 ทาง คือ ใน ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) จะถูกเปลี่ยนเป็นคีโตนบอดี (ketone bodies) เช่น acetoacetic acid และ β -hydroxybutyric acid โดยเอนไซม์ HMG-CoA synthase ส่วน ในไซโทพลาสซึม (cytoplasm) HMG-CoA จะถูกเปลี่ยนเป็น mevalonate โดย

เอนไซม์ HMG-CoA reductase และ mevalonate จะถูกเปลี่ยนไปเรื่อยๆ เป็นคอเลสเตอรอล ในที่สุด ดังรูปที่ 3

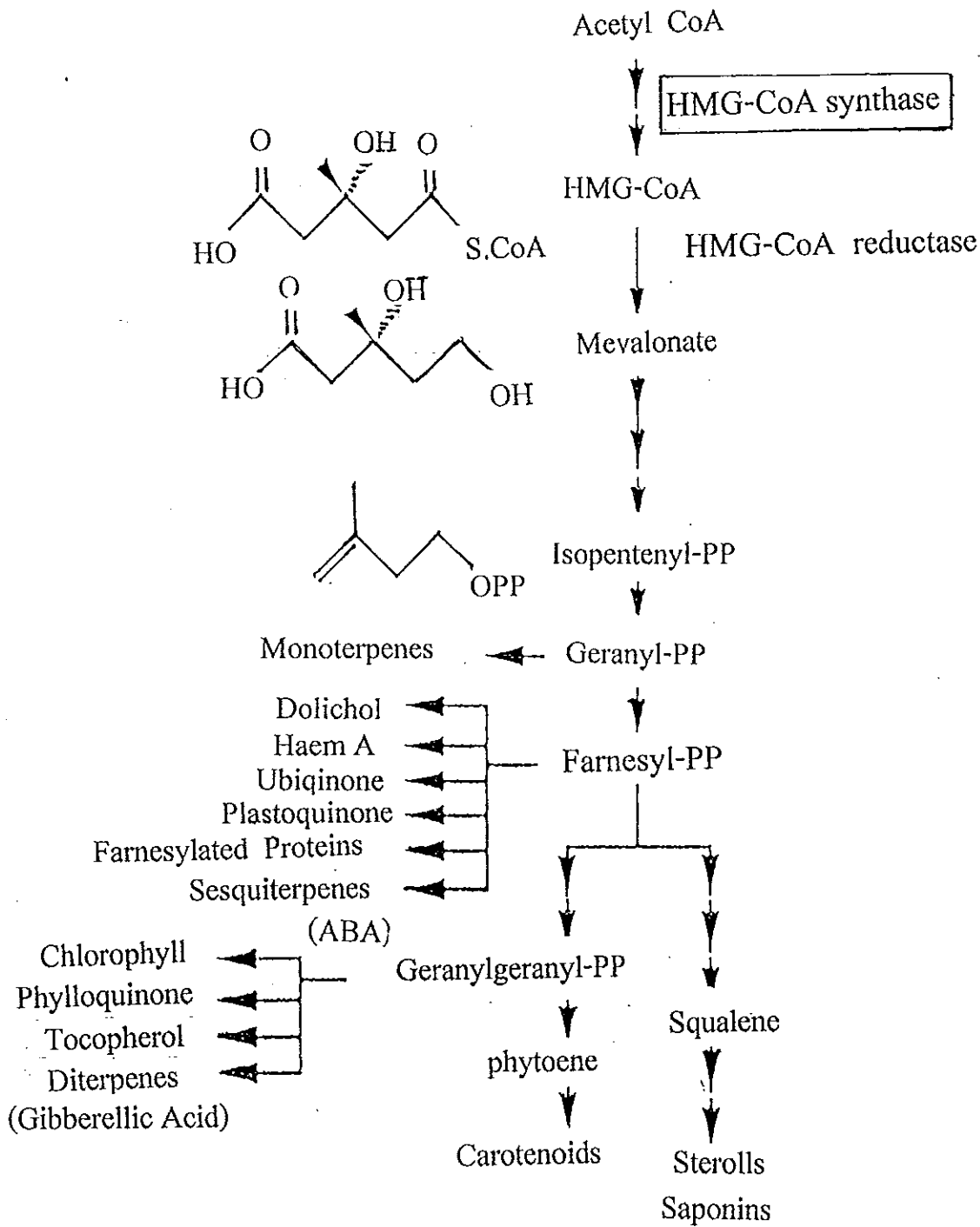
คอเลสเตอรอล (cholesterol) เป็นองค์ประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ และไลโปโปรตีนในเยื่อพลาสมาเมมเบรน และยังเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญของสารกลุ่มสเตอรอยด์ เช่น สเตอรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormone), วิตามินดี (vitamin D) และกรดน้ำดี (bile acid) เป็นต้น (Goldstein and Brown, 1990)

มนุษย์นอกจากจะสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในตับได้เองแล้ว ยังสามารถรับคอเลสเตอรอลจากอาหารที่รับประทานเข้าไปอีกด้วย เมื่อตับได้รับคอเลสเตอรอลจากอาหารมาก ระดับของเอนไซม์ HMG-CoA synthase จะลดลง และการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในตับจะลดลงด้วย ในทางตรงกันข้ามถ้าลดปริมาณคอเลสเตอรอลจากอาหารลง ตับจะสังเคราะห์คอเลสเตอรอลเพิ่มมากขึ้นและระดับเอนไซม์ HMG-CoA synthase จะเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน หากคอเลสเตอรอลอยู่ในร่างกายเกินความต้องการมากๆ ก็อาจทำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือด (arteriosclerosis) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมนี้ พบว่าการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลถูกควบคุมโดย HMG-CoA synthase และ HMG-CoA reductase (Mehrabian *et al.*, 1986)

ส่วนในพืช HMG-CoA ที่เกิดขึ้นในไซโทพลาซึม จะถูกเปลี่ยนเป็น mevalonate โดยเอนไซม์ HMG-CoA reductase และ mevalonate จะถูกเปลี่ยนไปเรื่อยๆ เป็น isopentenyl-PP, geranyl-PP โดย geranyl-PP ส่วนหนึ่งถูกเปลี่ยนเป็น monoterpenes อีกส่วนถูกเปลี่ยนเป็น farnesyl-PP โดย farnesyl-PP อาจถูกเปลี่ยนได้ 3 ส่วน คือ ส่วนหนึ่งถูกเปลี่ยนเป็น dolichol, haem A, ubiquinone, plastoquinone, farnesylated proteins, sesquiterpenes ส่วนที่สอง ถูกเปลี่ยนเป็น squalene และ squalene จะถูกเปลี่ยนไปเรื่อยๆ จนได้ sterols, saponins ส่วนที่สาม farnesyl-PP จะถูกเปลี่ยนเป็น geranylgeranyl-PP โดย geranylgeranyl-PP ส่วนหนึ่งถูกเปลี่ยนเป็น chlorophyll, phylloquinone, tocopherol และ diterpenes ตามลำดับ นอกจากนั้น geranylgeranyl-PP ยังสามารถเปลี่ยนไปเรื่อยๆ เป็น phytoene และ carotenoids ตามลำดับ ดังรูปที่ 4



รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงของ Acetyl CoA ในไมโทคอนเดรียและไซโตพลาสซึม (McGarry *et al.*, 1969)



รูปที่ 4 วิธีการเปลี่ยนแปลงของ Acetyl CoA ในพืช (Alam, et al., 1991)

การที่มีเอนไซม์ HMG-CoA synthase ทั้งในไมโทคอนเดรีย และในไซโตพลาสซึม เอนไซม์ในสองส่วนนี้ อาจมีบทบาทในการควบคุมการสังเคราะห์ HMG-CoA เพื่อการสังเคราะห์คีโตนบอดีและคอเลสเตอรอล ที่เป็นอิสระจากกัน เช่นการที่พบว่าสภาวะอดอาหาร (starvation) หรือเป็นเบาหวาน (diabetes) จะมีการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในตับลดลง แต่การสังเคราะห์คีโตนบอดีในตับกลับสูงขึ้น (Clinkenbeard *et al.*, 1975b)

ประวัติการค้นพบเอนไซม์ HMG-CoA synthase เริ่มมีการศึกษาค้นคว้ากันมากในสัตว์หลายชนิด เช่นการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในตับไก่ (Miziorko, 1985) และในปีเดียวกัน Lowe และ Tubbs (1985) ได้ศึกษาสมบัติและการสูญเสียความว่องไวโดยการเติมกลุ่ม succinyl ให้กับเอนไซม์ในตับวัวและบทบาทในการควบคุมการสังเคราะห์คีโตนบอดี Leonard และคณะ (1986) ได้ศึกษายีนสำหรับเอนไซม์ HMG-CoA synthase ของมนุษย์ Schnitzer-Polokoff และ Sinensky, (1987) ได้ศึกษาเอนไซม์ HMG-CoA synthase นี้ในตับหนู และในไซโตพลาสซึมของ chinese hamster ovary ชนิด CHO-K1 นอกจากนี้ Martinez-Gonzalez และคณะ (1993) สามารถแยก cDNA ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากแมลงสาบถึงระดับโมเลกุล

นอกจากนี้ Martinez-Gonzalez, (1993) แยก cDNA ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากแมลงสาบและต่อมา Adams และคณะ (1997) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียของหนู

ส่วนในพืชยังมีการศึกษาเอนไซม์ HMG-CoA synthase กันน้อยมาก ตัวอย่างพืชที่มีการศึกษาเอนไซม์นี้ได้แก่ ยางพารา โดย Lynen, (1969) ได้รายงานการพบเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในน้ำยางพารา สำหรับเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในซี-ซีรัมของน้ำยางพารา Suvachittanont และ Wititsuwannakul, (1995) ได้พบว่าเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในน้ำยางพารามีความว่องไวสูงกว่าความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในใบยาง

นอกจากการศึกษาเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในยางพาราแล้ว Alam และคณะ (1991) ได้ศึกษาเอนไซม์นี้ใน ผักขม (spinach), ถั่วเหลือง และถั่วลิสงที่สกัดได้จากใบ พบว่าเอนไซม์นี้สูญเสียความว่องไวของเอนไซม์ได้ง่ายโดยความว่องไวลดลงถึง 60 - 80 % ของความว่องไวทั้งหมดหากนำไปทำให้บริสุทธิ์ จึงทำให้การศึกษาเอนไซม์นี้ในพืชมีน้อยกว่าเอนไซม์ HMG-CoA reductase

Gondet และคณะ (1992) พบว่า การควบคุมการสังเคราะห์สเตอรอล จาก HMG-CoA reductase ขึ้นอยู่กับการทำงานของ acetoacetyl-CoA thiolase (AACT) และ HMG-CoA synthase ในต้นยาสูบ เช่นเดียวกับที่พบในต้นกล้าของหัวผักกาดหนู (radish) (Weber and Bach, 1993)

การหาความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ทำได้ 2 วิธี คือ spectrophotometric assay และ radiochemical assay (Miziorko *et al.*, 1985) ในวิธี spectrophotometric assay นั้นศึกษาได้โดยติดตามปฏิกิริยาระหว่าง acetyl CoA และ acetoacetyl CoA เป็น HMG-CoA ที่ความยาวคลื่น 300 นาโนเมตร โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ลดลงของ acetoacetyl CoA การศึกษาเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากซี-ซีรัมของน้ำยางพารา โดยใช้วิธี spectrophotometric assay พบว่าไม่อาจติดตามปฏิกิริยาได้ เนื่องจากซี-ซีรัมดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 300 นาโนเมตร ได้มาก การเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย ทำให้ผลการวิเคราะห์ไม่ถูกต้อง (Suvachittanont and Wititsuwannakul, 1995)

ส่วนวิธี radiochemical assay เป็นวิธีการที่วัดปริมาณสารกัมมันตรังสี (^{14}C) ที่ติดฉลาก (^{14}C -HMG-CoA) โดยเกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง ^{14}C - acetyl CoA และ acetoacetyl CoA ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์คือ ^{14}C -HMG-CoA ที่มีสารกัมมันตรังสี (^{14}C) ติดไปด้วย และต้องกำจัดเอา ^{14}C - acetyl CoA ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับ acetoacetyl CoA โดยการอุ่นให้ร้อนถึง 95 องศาเซลเซียส ใน 6 M HCl ^{14}C - acetyl CoA ที่เหลือจากปฏิกิริยาจะถูกกำจัดออกโดยการระเหยให้เหลือเฉพาะ ^{14}C -HMG-CoA ซึ่งไม่ระเหย (Miziorko, 1985)

1.2 แหล่งที่พบเอนไซม์ HMG-CoA synthase

เอนไซม์ HMG-CoA synthase พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดตั้งแต่ ยีสต์, พืช และสัตว์ รวมทั้งแมลง และในสัตว์ปีก เช่น ไก่ พบเอนไซม์นี้ในตับไก่ (Miziorko, 1985) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammals) หลายชนิด เช่น หนูขาว (rat), หนูขาวเล็ก (mice), แฮมสเตอร์, วัว และหมู จากการศึกษาพบว่า มีเอนไซม์อยู่ในอวัยวะต่างๆ ของ หนูขาว ในส่วนของสมอง (Patel and Clark, 1978), ลำไส้และไต (Thumelin *et al.*, 1993), ต่อมหมวกไต (adrenal gland) (Balasubramanian *et al.*, 1977), อัณฑะและรังไข่ (Royo *et al.*, 1993), ในแฮมสเตอร์ พบเอนไซม์นี้ใน รังไข่ (Schnitzer-Polokoff and Sinensky, 1987) ในวัวศึกษาในตับ (Lowe and Tubbs, 1985), ในหมู ศึกษาในตับและลำไส้ (Adams *et al.*, 1997) ส่วนในแมลง (แมลงสาบ) Martinez และคณะ (1993) ได้พบเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในรังไข่ ต่อมา Buesa และคณะ (1994) พบการแสดงออกของเอนไซม์นี้ในรังไข่, fat body ของแมลงสาบที่โตเต็มวัย

ในบางพาราคจะพบเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในน้ำยางพารา (Lynen, 1969) ซึ่งพบมากที่สุดในส่วนของซี-ซีรัม (Suvachittanont and Wititsuwannakul, 1995) นอกจากยางพาราแล้วได้มีการศึกษาเอนไซม์นี้ในใบของผักขม, ถั่วเหลือง และถั่วลิสง (Alam *et al.*, 1991) ซึ่งพบว่าเอนไซม์จากใบเหล่านี้เสียสภาพทางธรรมชาติได้ง่าย จึงไม่ได้มีการศึกษารายละเอียดต่างๆ ในต้นอ่อนของหัวผักกาดหนู Bach และคณะ (1991) ได้ทำการศึกษาพบว่าเอนไซม์มีลักษณะจับกับเยื่อ (membrane bound enzyme) Gondet และคณะ (1992) พบว่าเอนไซม์ acetoacetyl CoA thiolase และ HMG-CoA synthase ในต้นยาสูบที่มีการกลายพันธุ์ (mutant) จะมีความว่องไวของเอนไซม์ต่ำกว่าในต้นยาสูบที่เป็น พันธุ์ดั้งเดิม (wild type) ส่วน Van der Heijden และคณะ (1994) ได้ทำการแยก HMG-CoA synthase จากลำต้นของแพงพวยบก (*Catharanthus roseus*) พบว่าเอนไซม์มีความว่องไวของ acetoacetyl CoA thiolase รวมด้วย

1.3 สมบัติของเอนไซม์ HMG-CoA synthase

การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ HMG-CoA synthase มีการศึกษากันมานานตั้งแต่ปี 1975 เป็นต้นมา โดยความสนใจแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือในด้านการหาน้ำหนักโมเลกุล หน่วยย่อยของเอนไซม์และสมบัติต่างๆของเอนไซม์ อีกกลุ่มสนใจในด้านบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์โดยศึกษาในระดับโมเลกุล กลุ่มแรกเริ่มโดย Reed และคณะ (1975) ได้ทำให้เอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียจากตับไก่ และตับหนู บริสุทธิ์ขึ้น และศึกษาสมบัติของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ทั้งในไมโทคอนเดรีย และไซโตพลาสซึมจากตับไก่ พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) อยู่ระหว่าง 96,000-105,000 ดาลตัน ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย (subunit) โดยหน่วยย่อยนี้ มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 52,000 ดาลตัน มีค่า K_m ของการจับกับ acetyl CoA เท่ากับ 0.3-0.4 mM และค่า K_m ในการจับกับ acetoacetyl CoA มีค่าน้อยกว่า 2 μ M มีค่า pI (isoelectric point) เท่ากับ 7.2 ส่วนเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไซโตพลาสซึมที่แยกได้จาก ตับไก่ จะมีความแตกต่างจากเอนไซม์ในไมโทคอนเดรีย กล่าวคือ จะมีค่า pI 2 ค่า คือ 4.2 และ 6.7 ตามลำดับ นอกจากนี้ Mg^{2+} ที่ความเข้มข้น 20 mM ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรีย ได้สูงถึง 80% แต่จะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไซโตพลาสซึม ได้ 50%

Clinkenbeard และคณะ (1975 a, b) ได้ศึกษาเอนไซม์ HMG-CoA synthase ทั้งที่แยกได้จากตับไก่และตับหนู พบเอนไซม์นี้ในเมทริกซ์ (matrix) ของไมโทคอนเดรียและในไซโตพลาสซึม แต่ไม่พบเอนไซม์นี้ในไมโครโซม (microsome) และพบว่าเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไซโตพลาสซึมของตับไก่ มีรูปแบบไอโซไซม์ (isozyme) ได้ 4 รูปแบบที่แตกต่างจากในไมโทคอนเดรีย HMG-CoA synthase เอนไซม์ในไซโตพลาสซึม ทั้ง 4 นี้ได้แก่ HMG-CoA synthase I, HMG-CoA synthase II, HMG-CoA synthase III และ HMG-CoA synthase IV โดยเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไซโตพลาสซึม ที่พบมาก ได้แก่ HMG-CoA synthase I และ HMG-CoA synthase II เมื่อแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 90,000-1,000,000 ดาลตัน ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุล

อยู่ระหว่าง 54,000-58,000 คาลตัน เช่นเดียวกับเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากไมโทคอนเดรีย และเอนไซม์ที่อยู่ในรูปไดเมอร์ (dimer) นี้จะแยกออกจากกัน เมื่อมี KCl อยู่ด้วย นอกจากนั้น Mg^{2+} ยังยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียและ HMG-CoA synthase I ในไซโตพลาสซึม แต่เอนไซม์ HMG-CoA synthase II และ HMG-CoA synthase III จะถูกกระตุ้นให้สูงขึ้นโดย Mg^{2+} pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ของไซโตพลาสซึม ของตับไก่ คือ pH ในช่วง 9.2-9.4 ในสมองของไก่ จะพบ HMG-CoA synthase ในไซโตพลาสซึมแต่ไม่พบในไมโทคอนเดรีย (Clinkenbeard *et al.*, 1975a)

HMG-CoA synthase ในตับหนูต่างจาก HMG-CoA synthase จากตับไก่ ตรงที่พบว่า หนูมี HMG-CoA synthase ในไซโตพลาสซึม อยู่เพียงชนิดเดียว แต่ HMG-CoA synthase ในไซโตพลาสซึมจากตับทั้งของหนูและไก่จะตอบสนองต่อคอเลสเตอรอลในลักษณะของการควบคุมแบบย้อนกลับ (feed back control) กล่าวคือ ถ้าให้อาหารซึ่งมีคอเลสเตอรอลสูง ความว่องไวของเอนไซม์นี้จะลดลงเหลือเพียง 25% ของความว่องไวปกติ

ในกรณีของ Hep G2 (human hepatomacell) การสังเคราะห์เอนไซม์ HMG-CoA มีการเปลี่ยนแปลงตามสถานะของเซลล์ โดยมีการควบคุมควบคุมคู่ไปกับเอนไซม์ HMG-CoA synthase และ prenyl transferase (Rosser *et al.*, 1989) HMG-CoA synthase ในตับหมูจะแปรผันตามช่วงเวลาของวัน หรือ diurnal variation ด้วย (Royo, 1991) โดยพบว่ามีปริมาณโปรตีนและความว่องไวสูง ที่เวลา 10 นาฬิกา ในขณะที่ mRNA ของเอนไซม์นี้จะมีปริมาณสูงสุดที่เวลา 6 นาฬิกา แสดงว่ามีการสังเคราะห์ mRNA ก่อนที่จะมีการสังเคราะห์ โปรตีน และเอนไซม์ ถึง 4 ชั่วโมง และปริมาณโปรตีนและเอนไซม์ ณ จุดนี้จะสูงกว่าที่ระดับต่ำถึง 2 เท่า ส่วน mRNA ณ จุดสูงสุดจะสูงกว่าที่ระดับต่ำ ถึง 4 เท่า (Royo *et al.*, 1991) ซึ่งแสดงว่าการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ในไซโตพลาสซึมน่าจะเกิดได้ทั้งระดับการถอดรหัส (transcription) และการแปลรหัส (translation)

นอกจากนี้ ยังพบว่าเอนไซม์ จากไมโทคอนเดรียของหนู เมื่อนำไปฉีดกระจายเพื่อสร้างแอนติบอดี พบว่า แอนติบอดีที่ได้สามารถทำปฏิกิริยา กับเอนไซม์ HMG-

CoA synthase จากไมโทคอนเดรียเกิดการตกตะกอนได้แต่จะไม่ทำปฏิกิริยากับ เอนไซม์ HMG-CoA synthase จากไซโทพลาสซึมแสดงว่าเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากทั้งสองแหล่งนี้มีความแตกต่างกันและจากการศึกษาของ Royo และคณะ (1995) โดยใช้วิธี Western blot พบว่าแอนติบอดีต่อเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากไมโทคอนเดรียไม่สามารถทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่แยกได้จากไซโทพลาสซึม

กลุ่มที่สอง Mizorko และคณะ (1975); และ Mizorko และคณะ (1977) พบว่า acetyl group ของ acetyl CoA ซึ่งเป็นซับสเตรท (substrate) ของปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ HMG-CoA จับกับเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่หมู่ SH ของกรดอะมิโน ซิสเทอีน (cysteine) หรือ (cysteinyl sulfhydryl group) ซึ่งเป็นบริเวณเร่งของเอนไซม์นี้ ต่อมา acetoacetyl CoA (ซับสเตรทตัวที่ 2) จะเข้ามาทำปฏิกิริยากับ acetyl group ที่จับอยู่กับเอนไซม์ HMG-CoA synthase (acetyl-HMG-CoA synthase) ได้ผลิตภัณฑ์เป็น HMG-CoA ที่จับอยู่กับเอนไซม์ที่ cysteinyl sulfhydryl group บริเวณเร่งของเอนไซม์ ปฏิกิริยาขั้นตอนต่อไปจะมีการใช้น้ำ ในการสลายพันธะระหว่างผลิตภัณฑ์คือ HMG-CoA และเอนไซม์ HMG-CoA synthase ออกจากกัน Mizorko และ Behnke, (1985 a, b) ได้ศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase แบบไม่ย้อนกลับด้วย 3-chloropropionyl coenzyme A ซึ่งทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโน ซิสเทอีนที่บริเวณเร่ง พบว่า ลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียจากตับไก่เป็น hydrophilic และมีความคล้ายคลึงกับเปปไทด์ที่ได้จากบริเวณเร่งของแฮมสเตอร์ (UT-1 cell) ถึง 90% ต่อมา Misra และ Mizorko, (1996) ได้ศึกษาฮิสติดีน (histidine) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนอีกตัวหนึ่งที่มีอยู่ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ได้จากสัตว์ปีก มีบทบาทในการจับกับซับสเตรทตัวที่ 2 แล้วทำให้ปฏิกิริยาคำเนินต่อไปจนได้ผลิตภัณฑ์เป็น HMG-CoA

1.4 ปัจจัยที่มีผลต่อเอนไซม์ HMG-CoA synthase

นักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มได้ศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในการสังเคราะห์คีโตนบอดีและการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล

ในสัตว์ พบว่าเอนไซม์นี้ จะมีการเปลี่ยนแปลงได้เนื่องจากปัจจัยหลายๆอย่าง เช่น การได้รับอาหาร ระดับฮอร์โมน การผ่าตัดตัดตับออกบางส่วน (partial hepatectomy) รวมทั้งช่วงอายุ หรือวัยของสัตว์ที่อยู่ในระหว่างการเจริญเติบโต ซึ่งมีความสัมพันธ์กัน และมีผลต่อเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในรูปแบบต่างๆ

1.4.1 การควบคุมเอนไซม์ HMG-CoA synthase โดยสารอาหารที่มีอยู่ในอาหาร

การได้รับสารอาหารจากอาหารที่สัตว์กินเข้าไป และระดับฮอร์โมน มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณเอนไซม์ HMG-CoA synthase โดยมีการค้นคว้าจากนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่ม [Williamson *et al.*, (1968); Chang and Limanek (1980); Quant *et al.*, (1987); Salam *et al.*, (1988); Quant *et al.*, (1989); Casal *et al.*, (1992); Serra *et al.*, (1993); Prip-Buus *et al.*, (1995); Royo *et al.*, (1995) and Serra *et al.*, (1996)] โดย Williamson และคณะ (1968) พบว่าเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไซโตพลาสซึมของตับหนูที่เป็นโรคเบาหวาน และหนูที่กินอาหารที่มีไขมันสูง ตลอดจนในสภาวะอดอาหารมีความว่องไวของเอนไซม์สูง

นอกจากสภาวะอดอาหาร การกินอาหารที่มีไขมันสูง หรือการเป็นโรคเบาหวาน จะมีผลต่อเอนไซม์ HMG-CoA synthase ให้เพิ่มขึ้นในเซลล์จากเนื้อเยื่อต่าง ๆ แล้ว Chang และ Limanek (1980) พบว่า ลิปิด มีการเคลื่อนย้ายเข้าสู่ CHO cell ทำให้มีความว่องไว (activity) ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไซโตพลาสซึมเพิ่มขึ้น และการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลเพิ่มสูงถึง 16 เท่า ต่อมา Salam และคณะ (1988) พบว่า oleic acid และน้ำมันมะกอกในอาหารหนู ทำให้ความว่องไวจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไซโตพลาสซึม ในเซลล์ของตับหนู มีค่าสูงขึ้นซึ่งสอดคล้องกับที่พบในรายงานของ Siess และคณะ (1980) โดยพบว่า succinyl-CoA ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในเนื้อเยื่อตับหนู จะลดลงภายใน 10 นาทีหลังจากฉีดกลูคาγον (glucagon) หรือ dibutyryl cyclic AMP เช่นเดียวกับที่ Quant และคณะ (1987) พบว่า การสังเคราะห์คีโตนบอดีในหนูเพิ่มสูงขึ้น เมื่อหนูอยู่ในสภาวะอดอาหาร กินอาหารที่มีไขมันสูง หนูที่เป็นโรคเบาหวาน และหนูที่ถูกฉีดด้วยกลูคาγον และทำให้ความว่องไวทั้งหมด

(total activity) ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase เพิ่มสูงขึ้น 90% ของความว่องไวทั้งหมดพบในไมโทคอนเดรีย ความว่องไวของเอนไซม์ในระดับหนูเพิ่มขึ้น ภายใน 10 นาที หลังจากฉีดด้วยกลูคาگون เนื่องจากกลูคาгонจะลดปริมาณ succinyl-CoA ซึ่งเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียในตับ ทำให้ความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase สูงขึ้น

Quant และคณะ (1989) พบว่า ในตับของหนูที่ถูกฉีดด้วยกลูคาгон หรือ mannoheptulose จะมีความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase เพิ่มขึ้น และมีปริมาณของ succinyl-CoA ในไมโทคอนเดรียในตับลดลง การควบคุมการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase เป็นการควบคุมที่ระดับความว่องไวของเอนไซม์

Casal และคณะ (1992) ได้ศึกษาการแสดงออกในระดับโมเลกุล และพบว่า mRNA ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียเพิ่มสูงขึ้นในสภาวะอดอาหาร การกินอาหารที่มีไขมันสูงและสภาวะการเป็นโรคเบาหวาน นอกจากนี้ยังพบว่า การให้หนูอดอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำกลับมาให้กินอาหารใหม่ (refeeding) มีการแสดงออกในระดับ mRNA ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ลดลงสู่ระดับปกติภายในเวลา 2.5 ชั่วโมง และหนูเป็นโรคเบาหวานที่ได้รับการฉีดอินซูลิน (insulin) เข้าไป mRNA ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ลดลง 50% ด้วย

ต่อมาในปี 1993 Serra และคณะ ได้ศึกษาเอนไซม์ HMG-CoA synthase ทั้งในระดับ mRNA และปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ HMG-CoA synthase พบว่า หนูในสภาวะอดอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ในไมโทคอนเดรีย เพิ่มขึ้น 2 เท่า และเมื่อนำกลับมาให้กินอาหารใหม่ พบว่า ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์นี้ลดลงสู่ระดับปกติ ภายในเวลา 60 นาที เนื่องจากในสภาวะอดอาหาร สัดส่วนของ กลูคาгон / อินซูลิน เพิ่มสูงขึ้น กลูคาгонจะลดระดับของอินซูลินและเพิ่ม cAMP ให้สูงขึ้น ทำให้ความว่องไวของเอนไซม์ เพิ่มขึ้นด้วย Thumelin และคณะ (1993) พบว่าการฉีดอินซูลินให้แก่หนูในช่วงอดนมจะลดการสังเคราะห์คีโตนบอดีในลำไส้เล็ก แต่เมื่อฉีดกลูคาгон หรือ streptozotocin จะให้ผลตรงข้ามกัน

นอกจากนี้ Prip-Buus และคณะ (1995) พบว่า การแสดงออกของยีน HMG-CoA synthase ในระดับ mRNA ถูกควบคุมโดยอาหารที่มีไขมันสูง และมีการดูดซึมอาหารประเภทไขมันในปริมาณมาก สามารถกระตุ้นการถอดรหัสของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ของไมโทคอนเดรียจากเซลล์ตับ ของหนูที่โตเต็มวัย (adult) กลูกากอนจะทำให้มีการสร้างคีโตนบอดีเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับ Royo และคณะ (1995) ที่พบว่าลูกากอนปริมาณสูงกระตุ้นการสังเคราะห์คีโตนบอดี โดยกระตุ้นผ่านการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในขณะที่อินซูลินในปริมาณต่ำ สามารถลดการสังเคราะห์คีโตนบอดี

Ortiz และคณะ (1994) พบว่า เมื่อนำเอา cDNA ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ของไมโทคอนเดรีย เข้าสู่ Mev-1 cell ซึ่งมีความบกพร่องของเอนไซม์ HMG-CoA synthase และไม่สามารถเติบโตได้ในอาหารที่ไม่มี mevalonate, เซลล์ดังกล่าวจะเปลี่ยนเป็น สามารถเติบโตได้ในอาหารที่ไม่มี mevalonate เพราะมีการแสดงออกของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ของไมโทคอนเดรียได้

Serra และคณะ (1996) ได้ทำการศึกษาในหนูขาวเล็กลูกผสม (transgenic mice) ที่มียีนของ HMG-CoA synthase เชื่อมต่อกับยีนของ human growth hormone โดยใช้ promotor ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase และใช้ยีนของ human growth hormone เป็น reporter gene ในหนูลูกผสมนี้ จากการศึกษาพบว่า ตับของหนูขาวเล็กลูกผสมที่อดอาหาร จะมีระดับ mRNA ของ HMG-CoA synthase สูงขึ้น แต่เมื่อนำกลับมาให้กินอาหารใหม่ พบว่า ระดับ mRNA ของ HMG-CoA synthase ลดลงภายในเวลา 30 นาที เช่นเดียวกับหนูขาวเล็กลูกผสมที่ได้รับอินซูลินเข้าไป จะมีระดับ mRNA ของเอนไซม์ลดลง แสดงว่าการแสดงออกของยีน สำหรับ HMG-CoA synthase นั้นถูกควบคุมได้ แม้ว่ายีนนี้จะมิได้เป็นยีนที่มีอยู่ในสภาวะปกติก็ตาม

1.4.2 ระดับของเอนไซม์ HMG-CoA synthase กับการเจริญเติบโต

การศึกษากการแสดงออกของยีนในระดับโมเลกุลของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในหนูช่วงที่มีการเจริญเติบโตทางด้านร่างกาย ตั้งแต่แรกเกิด, ช่วงคุดนม (อายุ 1-20 วัน), ช่วงหย่านม (อายุ 21-30 วัน) จนกระทั่งโตเต็มวัย พบว่าเอนไซม์

HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรีย จากตับหนู มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ เอนไซม์นี้ในช่วงเวลาต่างๆกัน Benito และคณะ (1979) พบว่า ปริมาณเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในตับหนูแรกเกิด มีปริมาณเอนไซม์นี้สูงขึ้นตามอายุจนถึงช่วง คูดนม เช่นเดียวกับที่ Decaux และคณะ (1987) พบว่า mRNA ของเอนไซม์นี้ในตับ หนูจะสูงตลอดตั้งแต่แรกเกิด จนถึงช่วงคูดนมและจะค่อยๆลดลงเมื่อเข้าสู่ช่วงหย่านม นอกจากในตับหนูแล้ว Thumelin และคณะ (1993) พบว่าการแสดงออกในระดับ mRNA ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในลำไส้เล็กและไตของหนูในช่วงแรกเกิด จนถึงช่วงคูดนม จะสูงขึ้น และการแสดงออกของยีนนี้จะค่อยๆลดลงสู่ระดับปกติเมื่อ เข้าสู่ช่วงหย่านม

การแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อชนิดต่างๆกันอาจแตกต่างกันได้ โดย Hahn และ Taller (1987) พบว่าลำไส้เล็กของหนูในช่วงคูดนม จะมีการสร้างดีโตน บอดีสูงขึ้น และจะลดลงหลังจากหย่านม เมื่อหนูโตเต็มวัย การแสดงออกของยีน HMG-CoA synthase ในลำไส้จะไม่เกิดขึ้น แต่ในตับของหนูที่โตเต็มวัยยังมีระดับ mRNA ของไมโทคอนเดรีย HMG-CoA synthase ค้างอยู่ในระดับสูง ซึ่ง Topping และ Mayes (1982) ก็พบว่า mRNA ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไมโท คอนเดรียจากตับหนูในช่วงหย่านม แล้วกินอาหารที่มีไขมันสูง จะมีระดับ mRNA สูง ขึ้น นอกจากนั้น Gibbon และ Pullinger (1987) พบว่าหนูที่โตเต็มวัยมีการ แสดงออกของยีน HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียจากตับหนูและมีการตอบ สนองต่อ cyclic AMP, อินซูลิน และ dexamethasone ด้วยเช่นเดียวกัน การเจริญเติบโตของสัตว์ตั้งแต่แรกเกิดจนกระทั่งระยะโตเต็มวัย จะมีความสัมพันธ์กันระหว่างอายุ, สารอาหารที่สัตว์ได้รับเข้าไป และ การแสดงออกของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในระดับ mRNA ดังเช่นที่พบในรายงานของ Thumelin และคณะ (1993) และ Prip-Buus และคณะ (1995) พบว่าในตับของหนูในระยะแรกเกิด ถึง ช่วงคูดนมจะมีการ แสดงออกของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในระดับ mRNA เพิ่มสูงขึ้น จนกระทั่ง เริ่มลดต่ำลงเมื่อเข้าสู่ระยะหย่านม แต่เมื่อให้หนูช่วงที่คูดนมกินอาหารที่มีไขมันสูง ระดับ mRNA ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase และกลูคาγον เพิ่มสูงขึ้น แต่ อินซูลินลดต่ำลง และจะเกิดผลตรงข้าม เมื่อให้หนูกินอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตสูง

กล่าวคือเมื่อหนูช่วงที่อดนมให้กินอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตสูง พบว่าระดับ mRNA ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase และปริมาณกลูคาอนในกระแสเลือด ลดลงแต่ปริมาณอินซูลินในกระแสเลือดกลับเพิ่มสูงขึ้น

Duce และคณะ (1994) พบความว่องไวและปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในตับของลูกหมูแรกเกิด น้อยกว่าในตับหมูที่โตเต็มวัย เนื่องจากในตับหมูแรกเกิด มีอัตราการนำไขมันเข้าสู่ไมโทคอนเดรียต่ำ การเกิด β -oxidation จึงต่ำไปด้วยทำให้ปริมาณและความว่องไวของโปรตีน HMG-CoA synthase ต่ำลง

Casals และคณะ (1996) พบว่า การแสดงออกของยีน HMG-CoA synthase 1 และยีน HMG-CoA synthase 2 ที่ได้จาก fat body ของแมลงสาบ จะมีการแสดงออกในช่วงแรกของการสืบพันธุ์ ได้แตกต่างกัน โดยที่ HMG-CoA synthase 2 จะมีระดับ mRNA สูงที่สุดในช่วงแรกเกิด และจะลดลง ในเวลาต่อมา และเมื่อทดสอบโดยวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนไซม์ HMG-CoA synthase 1 และเอนไซม์ HMG-CoA synthase 2 ไม่พบระดับ mRNA ของ HMG-CoA synthase 1 แต่พบเฉพาะระดับ mRNA ของ HMG-CoA synthase 2 เท่านั้น แสดงว่า การแสดงออกของเอนไซม์ HMG-CoA synthase 1 ใน fat body ของแมลงสาบ จะถูกจำกัดบทบาทในการแสดงออกในขณะที่เอนไซม์ HMG-CoA synthase 2 ใน fat body ของแมลงสาบจะมีบทบาทในการแสดงออกของยีน HMG-CoA synthase ในระดับ mRNA มากกว่า HMG-CoA synthase 1

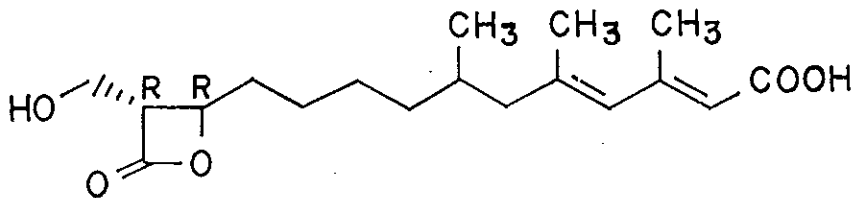
1.5 สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase

ในปี 1975 Reed และคณะ ได้รายงานว่ามีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียจากตับของสัตว์ปีกและในปีเดียวกัน Clinkenbeard และคณะ (1975a) ได้รายงานการพบ Mg^{2+} มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไซโตพลาสซึมของตับไก่ ต่อมา Mizioroko และ Behnke (1985b) ได้ศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียจากตับไก่บริเวณเร่ง ซึ่งมีลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโน เป็น Glu-Ser-Gly-Asn-Thr-Asp-Val-Glu-Gly-Ile-Asp-Thr-(Thr)-Asn-Ala-Cys-Tyr-Gly-Glu-

Thr-(Ala) โดย 3-chloropropionyl-CoA จะจับตรงบริเวณแรงแง โดยทำให้เกิด alkylation ของหมู่ sulhydryl group ใน cysteine บริเวณแรงแงทำให้เกิดการยับยั้งแบบไม่ย้อนกลับ (irreversible)

Lowe และ Tubbs (1985) ได้พบว่า succinyl-CoA (3-carboxypropionyl-CoA) ลดความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียจากตับวัวปกติ acetyl CoA จะจับกับ cysteine ตรงบริเวณแรงแงของเอนไซม์ HMG-CoA synthase แต่เมื่อมี succinyl-CoA จะจับกับเอนไซม์ HMG-CoA synthase ตรง cysteine ที่บริเวณแรงแงด้วยพันธะ thioester ด้วยค่าคงที่ของการจับ $340 \mu\text{M}$ และเกิด succinylation ด้วยอัตราคงที่ 0.57 ต่อนาที succinyl-enzyme ที่เกิดขึ้นจะสลายตัวโดยมีค่าครึ่งชีวิตประมาณ 40 นาที ($k = 0.017$ ต่อนาที) ที่ 30 องศาเซลเซียส และ pH 7

ต่อมา Greenspan และคณะ (1987) ได้สกัด L-659, 699 (E,E)-11-(3-(hydroxymethyl)-4-oxo-2-oxotany)-3,5,7-trimethyl-2,4-undecadienoic acid ที่แยกได้จาก *Fusarium* sp. ซึ่งมีโครงสร้างดังนี้



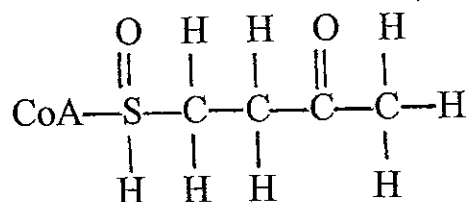
มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบบจำเพาะ (specific inhibition) ต่อเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไซโทพลาสซึมจากตับหนู มีค่า IC_{50} เท่ากับ $0.12 \mu\text{M}$ ต่อมา Greenspan และคณะ (1993) พบว่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไซโทพลาสซึมจากตับหนูจะถูกยับยั้งโดย L-659, 699 ซึ่งเป็นการยับยั้งแบบไม่ย้อนกลับ แต่จะยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล ใน cultured Hep G2 cell แบบย้อนกลับได้ (reversible) นั่นคือ เมื่อเปลี่ยนอาหารที่ไม่มีตัวยับยั้ง (L-659, 699) แทนอาหารเดิมที่มีตัวยับยั้ง พบว่ามีการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลสูงมากกว่าเลี้ยงในอาหารที่มีตัวยับยั้ง

Tomoda และคณะ (1987) พบว่า β -lactone ที่แยกได้จาก *Scopulariopsis* sp. (3,5,7-trimethyl-12-hydroxy-13-hydroxymethyl-2,4-tetradecadiendioic acid-12-14-lactone) หรือที่เรียกว่า F-244 สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไซโตพลาสซึมจากตับหนู อย่างจำเพาะเจาะจง ได้เช่นเดียวกับ L-659, 699

Bell และคณะ (1996) พบว่า F-244 สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในตับหนูและจากยีสต์ได้โดยยับยั้งแบบไม่ย้อนกลับเช่นเดียวกับในไซโตพลาสซึมในตับหนูและในตับมนุษย์มีค่า IC_{50} เท่ากับ 8 nM

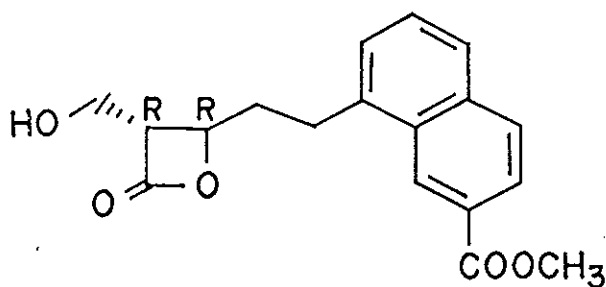
นอกจากนี้ ยังมีผู้ศึกษาเรื่องราวของสารยับยั้งเอนไซม์นี้อีกหลายคณะ เช่น Mayer และคณะ (1990) พบว่า ยาปฏิชีวนะ 1233 A มีสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในตับหนู อย่างจำเพาะเจาะจง และเป็นการยับยั้งแบบไม่ย้อนกลับ โดยแย่งจับกับ acetyl CoA ที่ cysteine ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ ด้วยพันธะ thioester เช่นเดียวกับ Nagashima และคณะ (1993) พบว่า 1233 A สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไซโตพลาสซึมจากตับของหนูขาวเล็ก และยังสามารถยับยั้งการสังเคราะห์สเตอรอยด์ ในตับโดยยับยั้งแบบไม่ย้อนกลับ ด้วยเช่นเดียวกัน

Charlier และคณะ (1997) ได้พบว่า 3-oxobutylsulfoxyl-Co A ยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไซโตพลาสซึม จากตับไก่ ซึ่งสูตรโครงสร้างของ 3-oxobutylsulfoxyl-CoA คือ



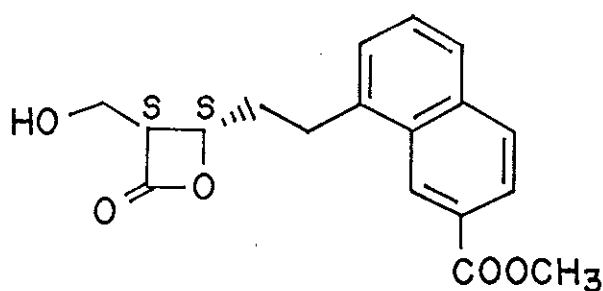
และเอนไซม์นี้สามารถกลับมามีความว่องไวได้เมื่อทำปฏิกิริยากับ DTT หรือ mercaptans ซึ่งจะสลายพันธะระหว่างเอนไซม์ HMG-CoA synthase และตัวยับยั้ง

Tomoda และคณะ (1997) พบว่าไอโซเมอร์ของ β -lactone DU-6622(3-hydroxy-2-hydroxymethyl)-5-(7-(methoxycarbonyl)-naphthalen-1-yl)pentanoic acid 1,3-lactone หรือ (2R,3R) DU-6622 ซึ่งมีสูตร

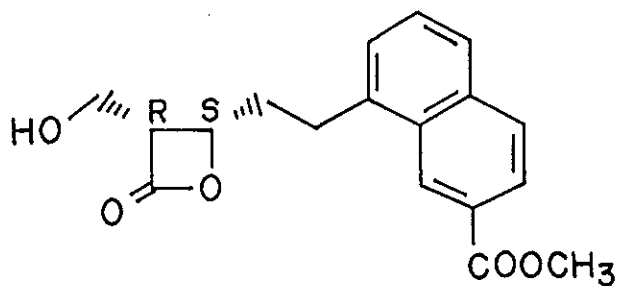


(2R, 3R) DU-6622

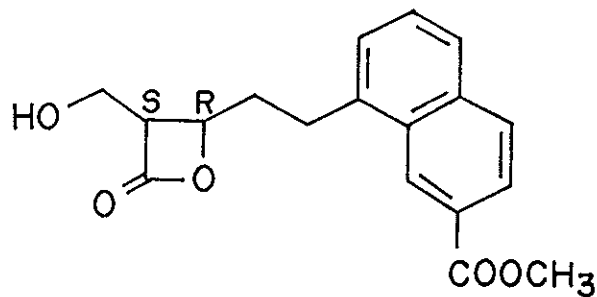
สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ได้ดีกว่า ไอโซเมอร์ β -lactone ตัวอื่นๆ เช่น (2S, 3S) DU-6622, (2R, 3S) DU-6622 และ (2S, 3R) DU-6622 ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังรูปข้างล่างนี้



(2S, 3S) DU-6622



(2R, 3S) DU-6622



(2S, 3R) DU-6622

1.6 การศึกษาเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในระดับโมเลกุลและยีน

1.6.1 การแสดงออกของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่มีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อ

เอนไซม์ HMG-CoA synthase ในสัตว์แต่ละชนิดจะมีอยู่เฉพาะในเนื้อเยื่อบางอย่างเท่านั้น (tissue specific) บางเนื้อเยื่อก็ไม่มีเอนไซม์นี้อยู่เลย ทราบได้จากการพบ mRNA ของเอนไซม์นี้เฉพาะในบางเนื้อเยื่อเท่านั้น นอกจากนี้การแสดงออกของเอนไซม์ในแต่ละเนื้อเยื่อยังอาจเปลี่ยนแปลงตามอายุของสัตว์ทดลองด้วย

Patel และ Clark (1978) พบเอนไซม์ HMG-CoA synthase ทั้งในไมโทคอนเดรียและในไซโทพลาสซึม จากสมองของหนูตลอดช่วงระยะดูคนมถึงระยะโตเต็มวัย แต่เอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไซโทพลาสซึม จะลดลงเมื่อโตเต็มวัยเนื่องจาก คีโตนบอดีเป็นยับยั้งที่สำคัญต่อสมองของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแรกเกิด (neonatal mammalian brain)

Serra และคณะ (1993a) พบว่า การแสดงออกของยีน HMG-CoA synthase จากไมโทคอนเดรียในลำไส้ของหนูในช่วงดูคนมมีระดับสูงและจะค่อยๆ ลดลงเมื่อหนูโตเต็มที่ และจะไม่มีการแสดงออกของยีน HMG-CoA synthase ในระดับ mRNA ในลำไส้เล็กของหนู แต่ในตับของหนูยังมีการแสดงออกของยีน HMG-CoA synthase ในระดับ mRNA ตั้งแต่แรกคลอดจนกระทั่งช่วงดูคนม และจะค่อยๆ ลดลง

เมื่อเข้าสู่ช่วงหย่านม และโตเต็มวัย เช่นเดียวกับ Thumelin และคณะ (1993) พบว่า mRNA ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในตับ, ลำไส้ และไตของหนู จะมีการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ตลอดช่วงคูนม และจะลดลงในหนูที่หย่านม จนถึงโตเต็มวัย แต่ในสมอง หัวใจ, เนื้อเยื่อไขมันทั้งสีน้ำตาลและสีขาว (brown and white adipose tissue) และในไตของหนูที่โตเต็มวัย จะไม่มีการแสดงออกของยีน HMG-CoA synthase ในระดับโมเลกุล แสดงว่า การแสดงออกของยีน HMG-CoA synthase มีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อ Cullingford และคณะ (1998) พบว่า mRNA ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในสมองของหนูในช่วงคูนมมีมากในส่วนซีรีเบลลัม (cerebellum) และจะลดลงเมื่อหนูหย่านมและกินอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตสูงหรืออาหารที่มีไขมันต่ำ

Asin และคณะ (1994) พบการแสดงออกของยีน HMG-CoA synthase ในการควบคุมการสังเคราะห์คีโตนบอดีและเมตาบอลิซึมของกรดไขมันในตับหนูที่ถูกตัดออกไปบางส่วน และกำลังสร้างกลับมาใหม่ (regenerating) พบว่าระดับของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรีย ลดลงจนถึงต่ำสุดภายใน 12 ชั่วโมงหลังการตัดและกลับสู่ระดับปกติภายใน 24 ชั่วโมง และจากการใช้ Western blot ในการศึกษาปริมาณ HMG-CoA synthase ก็ลดลงอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน

นอกจากนั้นแล้ว Royo และคณะ (1993) พบว่า mRNA ของยีน HMG-CoA synthase ในอัณฑะ (testis) และรังไข่ (ovary) ของหนูโตเต็มวัยมีการแสดงออกของยีนด้วย โดยที่เอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียจะมีบทบาทในการทำหน้าที่คล้ายกับเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไซโตพลาสซึม ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์คอเลสเตอรอลในอวัยวะสืบพันธุ์ (gonads) นอกจากการศึกษาการแสดงออกของยีน HMG-CoA synthase ในหนูแล้ว ยังมีนักวิทยาศาสตร์อีกกลุ่มที่ศึกษาการแสดงออกของยีนนี้ในหนูด้วยเช่นกัน คือ Adams และคณะ (1997) พบว่าการแสดงออกของยีน HMG-CoA synthase ในหนูจะมีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อดูด้วย แต่ลักษณะความจำเพาะของยีนนี้ในหนูจะแตกต่างจากในหนู กล่าวคือ จะไม่มีการแสดงออกของ mRNA ของยีน HMG-CoA synthase ในอัณฑะ ไต และลำไส้เล็กของหนู

นอกจากการแสดงออกของยีน HMG-CoA synthase ในหนูและหมู แล้ว Serra และคณะ (1996) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนนี้ในหนูขนาดเล็กลูกผสมที่ได้รับยีนใหม่ (transgenic mice) โดยการเชื่อมระหว่างเบส 1,148 ตัว ซึ่งเป็นส่วนของยีนสำหรับเอนไซม์ HMG-CoA synthase โปรโมเตอร์ และ human growth hormone นี้ พบเฉพาะในตับ, โคลอน (colon), ซีคัม (caecum), อัมตะ และรังไข่ แต่จะไม่มีการแสดงออกในไต, ลำไส้เล็ก, กล้ามเนื้อ, เนื้อเยื่อไขมันสีขาว, หัวใจ, ปอด และสมอง ทั้งในหนูขนาดเล็กลูกผสมแรกเกิดและโตเต็มวัย แสดงว่า ยีนสำหรับเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในส่วนโปรโมเตอร์สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนอื่นได้ด้วย

Martinez-Gonzalez และคณะ (1993) ให้ความสนใจ โดยพบว่า การแสดงออกของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในระดับ mRNA ในรังไข่ของแมลงสาบมากกว่า ที่พบในสมองและกล้ามเนื้อ ของแมลงสาบ เนื่องจากในแมลงจะมีการสังเคราะห์สารซึ่งไม่ใช่คอเลสเตอรอล (non-sterol) ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแมลง เช่น juvenile hormone ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ต่อไป

1.6.2 การพัฒนาการศึกษาเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในระดับโมเลกุล

Gil และคณะ (1986) ได้แยก และ หาลำดับเบสทั้งสายของ cDNA ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไซโตพลาสซึม ซึ่งมีขนาด 3.3 kb จากเซลล์มดลูกของแฮมสเตอร์ (UT-1 Cell) การเรียงตัวของเบสบน cDNA ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่แยกได้นี้ เมื่อถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน พบว่ามีการเรียงตัวของกรดอะมิโนตรงกับปลายของลำดับกรดอะมิโน บริเวณ NH₂-terminal ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่แยกได้

Ayte และคณะ (1990a) ศึกษาลำดับเบสบน cDNA ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไซโตพลาสซึม ในตับหนู โดยใช้ probe จากแฮมสเตอร์ พบว่า cDNA ของเอนไซม์จากตับหนูมีลักษณะคล้ายกับ เอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไซโตพลาสซึมของแฮมสเตอร์ ถึง 97% นอกจากนี้ Ayte และคณะ (1990b) ยังพบว่า เอนไซม์ HMG-CoA synthase ทั้งในไซโตพลาสซึมและในไมโทคอนเดรียจะถูกควบคุมโดยยีน 2 ชนิด ที่แตกต่างกัน cDNA ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียจากตับหนูจะมีรหัสสำหรับกรดอะมิโน มีส่วนคล้ายคลึงกับเอนไซม์นี้

ในส่วนไซโทพลาสซึม ถึง 65% และส่วนของเอนไซม์ตรงบริเวณเร่งคล้ายกับเอนไซม์นี้ในไซโทพลาสซึมของตับไก่ ถึง 90% และเมื่อนำ cDNA มาศึกษาการแสดงออกใน *Escherichia coli*. พบว่า โปรตีนที่ได้มีความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase และมีกรดอะมิโนอีก 37 ตัว ที่ไม่พบในเอนไซม์จากไซโทพลาสซึม ข้อมูลนี้รวมกับการพบขนาดของ mRNA สำหรับเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียและในไซโทพลาสซึม ที่แตกต่างกัน คือ ในไมโทคอนเดรียมีขนาด 2 kb และในไซโทพลาสซึมมีขนาด 3.4 kb แสดงว่า มียีนของเอนไซม์ HMG-CoA synthase 2 ยีน คือ ยีน HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียและยีน HMG-CoA synthase ในไซโทพลาสซึม

Mascaro และคณะ (1995) ได้ศึกษา cDNA ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากตับมนุษย์ ซึ่งมีขนาด 2,058 bp และเป็นรหัสของโพลีเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 508 ตัว ขนาด 56,635 ดาลตัน cDNA ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียจากมนุษย์นี้เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนในโปรตีนที่ได้ของมนุษย์กับ เอนไซม์ HMG-CoA synthase ไมโทคอนเดรียจากตับหนู และในไซโทพลาสซึมของตับมนุษย์ พบว่า เอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียจากตับมนุษย์ จะมีลำดับกรดอะมิโนในโปรตีนคล้ายคลึงกับ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียจากตับหนู มากกว่า HMG-CoA synthase ในไซโทพลาสซึมของมนุษย์ โดย HMG-CoA synthase ในไซโทพลาสซึมของมนุษย์ไม่มีกรดอะมิโนด้าน N-terminal ที่ทำหน้าที่เป็น leader peptide ในการนำเอนไซม์ เข้าสู่ไมโทคอนเดรียของมนุษย์

Leonard และคณะ (1986) ได้ศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในยีนผสมระหว่างเซลล์มนุษย์ และ Mev-1 cell ซึ่งเป็น chinese hamster somatic cells ที่มีความผิดปกติของเอนไซม์ HMG-CoA synthase โดยดูความแตกต่างของความว่องไวของเอนไซม์ ที่ถูกยับยั้งโดย Mg^{2+} ในเซลล์ลูกผสมต่างๆที่ได้ พบว่า ตำแหน่งโครงสร้างของยีน HMG-CoA synthase ที่มีบทบาทในการควบคุมการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล ของเซลล์มนุษย์อยู่ที่โครโมโซมคู่ที่ 5

Mehrabian และคณะ (1986) ได้ศึกษาการควบคุมการแสดงออกของ

ยีน HMG-CoA synthase ในตับหนู พบว่าอาหารมีผลต่อการสังเคราะห์ HMG-CoA synthase ในไซโทพลาสซึมและยังได้ศึกษาว่าการสังเคราะห์ HMG-CoA synthase จะมีกลไกการควบคุม เช่นเดียวกับ การสังเคราะห์ HMG-CoA reductase หรือไม่ โดยกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์ HMG-CoA synthase ด้วยอาหารที่มียาพวก cholestyramine และ mevilonin ซึ่งจะมีปริมาณเอนไซม์ สูงขึ้น ถึง 9 เท่า และถ้าหนูที่กินอาหารที่มียานี้ได้รับ mevalonolactone ระดับของเอนไซม์นี้ก็จะลดลง ถึง 5 เท่า ภายใน 3 ชั่วโมง แสดงว่าการควบคุมการเกิดที่ระดับ mRNA และเกิดร่วมกับการทำงานของ HMG-CoA reductase ซึ่งปกติจะเปลี่ยน HMG-CoA ให้เป็น mevalonolactone นอกจากนี้ ยังได้ศึกษาตำแหน่งของยีนสำหรับ HMG-CoA synthase และยีนของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ของมนุษย์ พบว่า ตำแหน่งยีนของเอนไซม์นี้ อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 5 ของเซลล์มนุษย์เช่นเดียวกัน และจากการศึกษาโดยการตัดยีนบางส่วนของโครโมโซมคู่ที่ 5 ออกไป พบว่ายีนของเอนไซม์ทั้งสองนี้มีได้อยู่ใกล้กัน การแสดงออกของเอนไซม์ทั้งสองนี้จึงไม่น่าจะถูกควบคุมโดยยีนควบคุมชุดเดียวกัน

Ayte และคณะ (1993a) พบว่า การเติม methyl (methylation) บริเวณปลายด้าน 5' ของยีน HMG-CoA synthase บริเวณโปรโมเตอร์ และนำเข้าสู่เซลล์ตับในหลอดทดลอง ทำให้การถอดรหัสถูกยับยั้ง แสดงว่า การเติม methyl มีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของยีน HMG-CoA synthase นอกจากนั้น Ayte และคณะ (1993b) ยังพบว่า บริเวณปลายด้าน 3' ที่ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการถอดรหัสของยีน HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรีย ของหนูมีการเรียงตัวของเบสซ้ำๆ กลับด้านไปมาอยู่ 4 แห่ง ซึ่งเกี่ยวข้องกับความคงตัว (stable) ของ mRNA โดยมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงครึ่งชีวิตของ mRNA ซึ่งตอบสนองต่อฮอร์โมนด้วย

Gil-Gomez และคณะ (1993) ศึกษา ยีนที่ควบคุมเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียของตับหนู พบว่า ณ บริเวณที่ 1,149 bp เป็นจุดที่เริ่มมีการถอดรหัสของเอนไซม์ แต่เมื่อลดจำนวนเบสของยีนลง ให้มีขนาดเหลือเพียง 142 bp ยังสามารถช่วยให้มีการถอดรหัสในเซลล์ตับได้ด้วยเช่นกัน

Martinez-Gonzalez และคณะ (1993) ได้แยก cDNA ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ซึ่งมีขนาด 1,658 bp จากแมลงสาบ โดยใช้ cDNA ของ HMG-CoA synthase จากแฮมสเตอร์เป็น probe พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA เมื่อถอดรหัสเป็น โพลีเปปไทด์ 453 กรดอะมิโน (MW. = 50,338 ดาลตัน) ซึ่งคล้ายกับที่พบในเอนไซม์ HMG-CoA synthase ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง 74-75% นอกจากนี้ยังได้มีการแยกเอนไซม์ HMG-CoA synthase ชนิดใหม่จากแมลงสาบออกมาพบว่ามี 455 กรดอะมิโน (MW. = 51,424 ดาลตัน) มีความคล้ายคลึงกับ cDNA ที่เคยแยกได้ 69% และทั้งคู่ไม่มี leader peptide ทางปลาย N-terminal ที่จะนำเข้าสู่ไมโทคอนเดรีย

Dooley และคณะ (1998) พบว่าโปรโมเตอร์ของ ยีน HMG-CoA synthase มี binding site อยู่ 2 แห่ง สำหรับ sterol regulatory element-binding proteins สำหรับควบคุมการสร้าง sterol ของยีน HMG-CoA synthase เมื่อมีระดับ sterol ต่ำยังมีอีกส่วนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุม (co-regulatory) ซึ่งทำงานร่วมกันกับการจับกันระหว่าง sterol regulatory element-binding proteins และ ตัวอย่างของ coregulatory transcription binding site ก็คือ trimeric CCAAT-binding factor/ nuclear factor Y ซึ่งมีบทบาทในการควบคุมการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลด้วย

1.7 เอนไซม์ HMG-CoA synthase ในน้ำยางพารา

เอนไซม์ HMG-CoA synthase และ เอนไซม์ HMG-CoA reductase เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการสร้างยางพารา (Lynen, 1969) โดยทั้ง HMG-CoA synthase และ HMG-CoA reductase ต่างก็มีบทบาทในการควบคุมการสร้างยางพาราทั้งคู่ ในขณะที่เอนไซม์ HMG-CoA reductase ได้ทำการศึกษากันอย่างกว้างขวาง จนถึงระดับยีน [Lynen, (1969); Sipat, (1982); Wititsuwannakul *et al.*, (1988); Wititsuwannakul *et al.*, (1990) และ Chye *et al.*, (1992)]

แต่เอนไซม์ HMG-CoA synthase ในน้ำยางพารายังไม่มีการศึกษากันมากนัก ความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในน้ำยางพาราสูงกว่าความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA reductase หลายเท่า [Lynen, (1969), Wititsuwannakul *et al.*, (1988)] ในน้ำยางพารามีความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase 232

nmole/min/ml latex ส่วนเอนไซม์ HMG-CoA reductase มีความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA reductase 0.178 mole/min/ml latex (Wititsuwannakul, *et al.*, 1988)

เอนไซม์ HMG-CoA synthase ในน้ำยางพารา จะกระตุ้นการใช้ acetyl CoA เพื่อสังเคราะห์เป็น isoprene ซึ่งคล้ายกับการสังเคราะห์ คอเลสเตอรอลในสัตว์ เลี้ยงลูกด้วยนม เช่นเดียวกับที่ Hepper และคณะในปี 1969 พบว่า HMG-CoA ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาของการสังเคราะห์ยางจะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น mevalonate ซึ่งมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ยาง

Suvachittanont และ Wititsuwannakul (1995) พบว่า ในน้ำยางพาราในส่วน ซี-ซีรัม จะมีเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่เกี่ยวข้องกับ การสังเคราะห์ isoprene สูงกว่าในใบยาง แสดงให้เห็นว่าการสังเคราะห์ยางของ ต้นยาง เกิดขึ้นที่เซลล์สร้างยาง (laticifers) มากกว่าที่ใบของต้นยาง ซึ่งสอดคล้องกันกับ Kush และคณะ (1990) ที่พบว่า มีการแสดงออกของยีน HMG-CoA synthase และยีน HMG-CoA reductase เป็นปริมาณสูงอยู่ในเซลล์สร้างยาง เมื่อเทียบกับใบ

เอนไซม์ HMG-CoA synthase ในซี-ซีรัม จะมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่ กับช่วง เวลาการกรีด (Suvachittanont and Wititsuwannakul, 1995) โดยเอนไซม์นี้ในซี-ซีรัม จากต้นยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีความว่องไวของเอนไซม์นี้สูง จะมีความว่องไวสูงที่สุด เมื่อเวลา 22 นาฬิกา เวลาที่ความว่องไวของเอนไซม์สูงสุดในต้นยางพาราแตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่าระดับความว่องไวของเอนไซม์ในซี-ซีรัมจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณเนื้อยางแห้ง (dried rubber content) โดยมี สัมพันธ์ (correlation coefficient) 0.81 แสดงว่าเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในน้ำยางพาราน่าจะมีบทบาทโดยตรงในการควบคุมการสังเคราะห์ยางผ่านการเกิด HMG-CoA

สุริย์ (2539) ได้ทำการศึกษาเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในซี-ซีรัมโดยทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น และศึกษาสมบัติของเอนไซม์ พบว่า เอนไซม์นี้สูญเสียสภาพธรรมชาติได้ง่าย การศึกษานี้เป็นการหาข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับสมบัติต่างๆของเอนไซม์นี้ให้มากขึ้น และเตรียมเอนไซม์บริสุทธิ์ให้มีปริมาณมากพอ เพื่อใช้ในการ

กระตุ้นการสร้างแอนติบอดี ในสัตว์ทดลองและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบคุณภาพพันธุ์ยาง โดยวิธี Western blot และ ELISA

วัตถุประสงค์

1. แยกเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากซี-ซีรัมของน้ำยางพาราให้บริสุทธิ์ โดยวิธีมาตรฐานทางชีวเคมี เช่น การแยกโดยวิธีโศมาโตกราฟีทั้งแบบแลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose และ เจลฟิльтраชันโดยใช้ (Sephadex G-75) และการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส และแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ได้มากเพียงพอที่จะนำไปใช้ในการศึกษาสมบัติต่าง ๆ ต่อไป

2. ศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากซี-ซีรัมของน้ำยางพาราที่ผ่านขั้นตอนการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์เพิ่มเติม เช่น หาน้ำหนักโมเลกุล, หาค่า pI

3. ศึกษาถึงอิทธิพลของสารที่เป็นตัวยับยั้งการทำลายของเอนไซม์ ซึ่งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในแหล่งอื่นๆ

4. นำเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่แยกได้มาฉีดกระตุ้นกระต่าย และหนู เพื่อให้มีการสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อเอนไซม์นี้

5. หานแนวทางในการนำแอนติบอดีที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณของเอนไซม์ต่อไป

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. ตัวอย่างน้ำยางสด
2. ถ้วยพลาสติก หรือถุงพลาสติก สำหรับรองรับน้ำยางสด
3. น้ำแข็งสำหรับแช่น้ำยางสดเพื่อป้องกันการแข็งตัวของน้ำยางสด
4. กระจกน้ำแข็ง
5. มีดกรีดยาง
6. ท่อโลหะขนาดเล็ก สำหรับตอกติดกับต้นยางเพื่อให้น้ำยางไหลลงภาชนะที่รองรับ
7. ผ้าขาวบาง สำหรับกรองน้ำยางพารา

สัตว์ทดลอง

1. กระต่ายพันธุ์ขาวตาแดง (New Zealand White rabbit) ตัวผู้ น้ำหนักประมาณ 3 กิโลกรัม
2. หนู (Wistar rat) น้ำหนักประมาณ 250 กรัม

สารเคมี

ชื่อสารเคมี	M.W.	บริษัทที่ผลิต
acetoacetyl CoA	851.6	Sigma
acetyl CoA	809.6	Sigma
acrylamide	71.1	Merck

ชื่อสารเคมี	M.W.	บริษัทที่ผลิต
ammonium persulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$)	228.7	Merck
ammonium sulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	132.14	Carlo Erba
anti - rabbit Ig G peroxidase conjugate	-	Sigma
Bacto agar	65.01	Difco
bovine serum albumin (BSA)	67,000	Pharmacia
bromophenol blue	-	Sigma
carrier ampholyte	-	BIO-RAD
CM-cellulose cation exchanger	-	Sigma
CM-cellulose 23	-	Whatman
Coomassie brilliant blue R250	-	Sigma
cupric sulphate (CuSO_4)	249.68	Sigma
dimethyl POPOP	-	Sigma
dimethyl sulfoxide (DMSO)	78.13	Riedel - de Haen
dipotassium hydrogen orthophosphate anhydrous (K_2HPO_4)	174.18	Merck
disodium hydrogen phosphate dihydrates ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	177.99	Ajax
ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA)	292.2	Fluka
folin phenol reagent	-	Sigma
Freund's adjuvant complete	-	Sigma
glacial acetic acid	60.05	Merck
glycerol	92.09	BDH
glycine	75.07	Merck
hydrochloric acid (HCl)	36.46	Merck
hydrogen peroxide	34.02	Fluka

ชื่อสารเคมี	M.W.	บริษัทที่ผลิต
isopropanol	60.097	Carlo Erba
L-659, 699	-	Merck
methanol (CH ₃ OH)	32.04	BDH
2-mercaptoethanol	78.13	Merck
N,N' - methylene bis acrylamide	154.2	Merck
N,N,N',N' - tetramethylene diamine (TEMED)	116.2	Sigma
<i>o</i> -dianisidine	244.3	Sigma
potassium chloride (KCl)	74.555	Carlo
potassium dichromate (K ₂ Cr ₂ O ₇)	294	Sigma
potassium dihydrogen phophate (KH ₂ PO ₄)	136.1	Merck
potassium sodium tartrate	282.23	Carlo Erba
PPO (2,5- diphenyloxazole)	221.3	Sigma
riboflavin	376.37	BHD
sephadex G-75	-	Pharmacia
sodium acetate (CH ₃ COONa ₃ H ₂ O)	136.08	Carlo Erba
sodium azide (NaN ₃)	65.01	Sigma
sodium carbonate anhydrous (Na ₂ CO ₃)	105.99	Fluka
sodium chloride	58.44	Merck
sodium dihydrogen orthophophate (NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O)	156.01	Merck
sodium dodecyl sulfate (SDS)	288.4	Merck
sodium hydroxide (NaOH)	40	Merck
tris(hydroxy methyl)aminomethane	121.14	Fluka

ชื่อสารเคมี	M.W.	บริษัทที่ผลิต
triton X-114	-	Sigma
tween 20 (polyoxyethylene sorbitanmonolaurate)	-	Fluka
xylene	-	Hopkin Williams

อุปกรณ์

เครื่องมือที่ใช้มีดังนี้

1. เครื่องอัลตราเซนตริฟิวจ์ ultra centrifuge รุ่น UC L8-70 M ของ Beckman, U.S.A
2. เครื่องเซนตริฟิวจ์ รุ่น JA 21 ของ Beckman, U.S.A.
3. เครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์ รุ่น Z 252 ของ MK chermle, U.S.A.
4. เครื่องเก็บสารตัวอย่าง fraction collector รุ่น 2110 ของ Biorad, U.S.A.
5. Power supply รุ่น 1000 / 500 ของ Biorad, U.S.A.
6. Slab gel electrophoresis apparatus ของ ATTO, Japan
7. เครื่องดูดกลืนแสง (UV-VIS recording spectrophotometry) รุ่น UV 160A ของ Shimadzu, Japan
8. เครื่องผสมสารละลาย (magnetic stirrer) รุ่น HB 502, England
9. ไมโครเพลท (E.I.A. plate) ของ Cotsar, USA
10. เครื่องวัดสารกัมมันตรังสี รุ่น LS 5000 ของ TD Beckman, USA
11. ตู้แช่แข็ง (-20°C) Sanyo, Japan
12. ตู้แช่แข็ง (-70°C) Science Temp. lo - cold Freeze Adrian, U.S.A.
13. Microtube pump รุ่น MP-3 ของ EYELA, Japan
14. Water bath, ของ Buchi
15. เครื่องวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายในไมโครเพลท (microplate autoreader) รุ่น ELX 808 ของ BIO-TEX Instruments INC, U.S.A

วิธีการ

2.1 การเก็บน้ำยางพารา

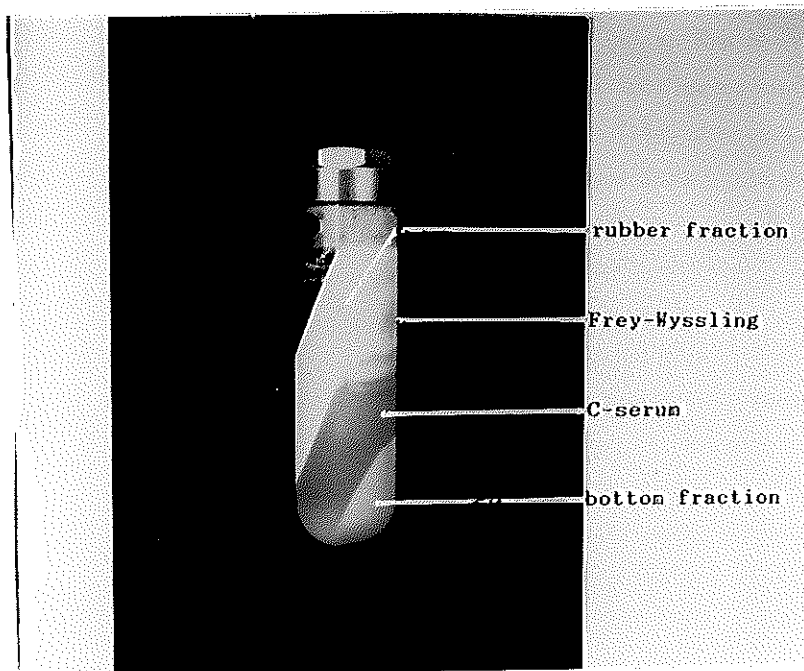
เก็บน้ำยางพาราจากต้นยางพันธุ์ RRIM 600 มีอายุประมาณ 20 ปี จากศูนย์วิจัยยางสงขลา อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา โดยการกรีดแบบครึ่งลำต้น วันเว้นวัน (S/2 D/2) การเก็บน้ำยาง จะนำถ้วยพลาสติก ซึ่งแช่อยู่ในน้ำแข็งตลอดเวลา ไปรองรับน้ำยาง (ดังรูปที่ 5) รวบรวมน้ำยางที่ได้ใส่บีกเกอร์ซึ่งแช่อยู่ในน้ำแข็ง นำกลับห้องปฏิบัติการทันที



รูปที่ 5 การเก็บน้ำยางพาราจากต้นยางพารา

2.2 การปั่นแยกน้ำยางพารา

กรองน้ำยางพาราที่เก็บได้จากข้อ 2.1 ด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นจึงแบ่งใส่หลอดเซนตริฟิวจ์และนำไปเซนตริฟิวจ์ด้วยเครื่องอุลตราเซนตริฟิวจ์ (Beckman L8-70 M ultracentrifuge) ใช้แรงเหวี่ยง $49,000 \times g$ เป็นเวลา 45 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส น้ำยางพาราที่ผ่านการเซนตริฟิวจ์จะแยกออกเป็น 4 ชั้น ตามลักษณะความหนาแน่นของส่วนประกอบ ในน้ำยาง ชั้นที่ 1 (ชั้นบนสุด) เป็นยางสีขาว (rubber fraction) ชั้นที่ 2 เป็นแถบสีเหลือง (Frey - Wyssling particles) ชั้นที่ 3 เป็นชั้นของเหลวใส เรียกว่า ซี-ซีรัม (C-serum) และชั้นที่ 4 เป็นชั้นของตะกอนก้นหลอด (bottom fraction) ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 การแยกชั้นของน้ำยางพาราที่ผ่านการเซนตริฟิวจ์ ด้วยเครื่องอุลตราเซนตริฟิวจ์ แรงเหวี่ยง $49,000 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที

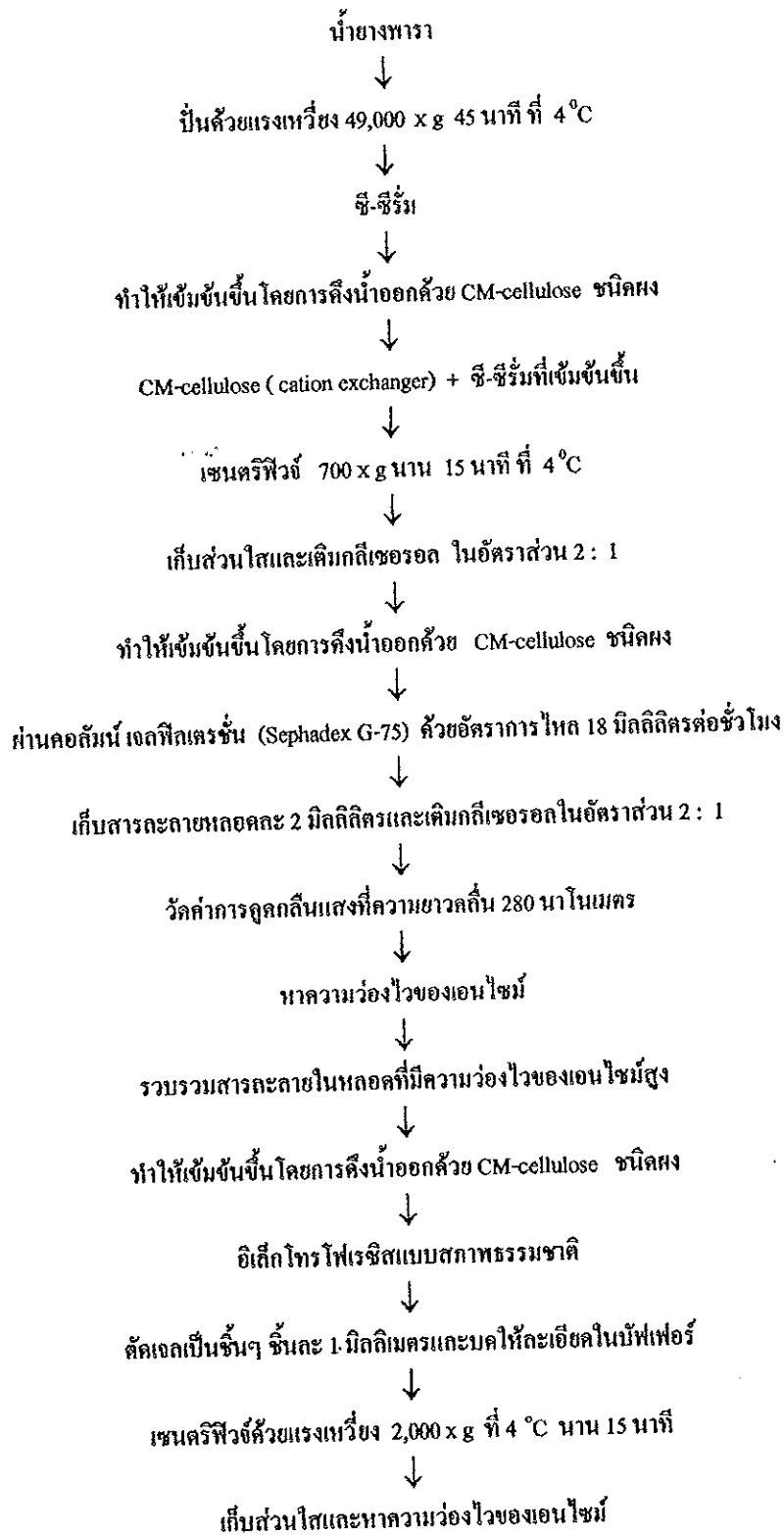
2.3 การเก็บส่วนของชั้น ซี-ซีรัม

หลังจากการเซนตริฟิวจ์น้ำยางในข้อ 2.2 ใช้ช้อนตักสาร ตักส่วนของยางชั้นบนสุดออก ใช้หลอดหยดดูดเอาส่วนของ Frey - Wyssling ซึ่งเป็นแถบสีเหลืองออก และดูดเอาส่วนของของเหลวใส (ซี-ซีรัม หรือ C-serum) มากรองผ่านผ้าขาวบาง 4 ชั้น แล้วนำ ซี-ซีรัม ที่ได้ไปใส่หลอด นำไปเซนตริฟิวจ์ซ้ำอีกครั้ง ด้วยแรงเหวี่ยงสูง 49,000 x g เป็นเวลา 45 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วน ซี-ซีรัม ที่มีความใสมากขึ้น ใส่หลอดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บไว้ใช้ในการเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ต่อไป

2.4 การทำให้เอนไซม์จาก ซี-ซีรัมบริสุทธิ์ขึ้น

การทำให้เอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่มีอยู่ในส่วนซี-ซีรัมของน้ำยางพารา มีความบริสุทธิ์ขึ้น โดยอาศัยวิธีการทางชีวเคมี เช่น โครมาโตกราฟีและอิเล็กโตรโฟรีซิส ดังสรุปขั้นตอนการทำให้เอนไซม์จากซี-ซีรัมบริสุทธิ์ขึ้น ในไดอะแกรมรูปที่ 7

ในการศึกษานี้ได้ใช้ซี-ซีรัมจากน้ำยางพารา มาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการคั่งน้ำออกด้วย CM-cellulose ชนิดผง และใส่ลงใน CM-cellulose cation exchanger และนำมาทำให้เข้มข้นขึ้นอีกครั้ง โดย CM-cellulose ชนิดผง แล้วนำไปแยกโดยเจลฟิลเตรชัน ก่อนที่จะนำไปผ่านอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสภาพธรรมชาติเพื่อตัดเจลและบดใน 0.1 M Tris-HCl, pH 8.2 ดังรูปที่ 9



รูปที่ 7 โคอะแกรมการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น

2.4.1 การแยกเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากซี-ซีรัมให้บริสุทธิ์ขึ้น โดยใช้โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ ด้วย CM-cellulose cation exchanger

เตรียม CM-cellulose resin โดยแช่ CM-cellulose 10 กรัม ใน 0.5 M HCl 300 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เทส่วนในทิ้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นจน pH มีค่าเท่ากับ pH ของน้ำกลั่น (pH 6.7) เติม 0.5 M NaOH แช่ไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เทส่วนในทิ้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นจน pH มีค่าเท่ากับ pH ของน้ำกลั่น เติม 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5 แช่ไว้ประมาณ 30 นาที เทส่วนในทิ้ง และล้างด้วย 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5 จนได้ pH 7.5

นำ CM-cellulose cation exchanger ที่เตรียมเรียบร้อยแล้ว มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 3 cm x 9 cm แล้วจึงนำซี-ซีรัม 10 มิลลิลิตรมาใส่ในหลอดทดลอง ที่มี CM-cellulose cation exchanger ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ปริมาณโปรตีน 38 มิลลิกรัม คนเบาๆ ให้ซี-ซีรัมสัมผัสกับ CM-cellulose cation exchanger ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 700 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนในซึ่งมีเอนไซม์ที่ไม่จับกับ CM-cellulose cation exchanger (สุริย์, 2539) แล้วนำไปเติมกลีเซอรอลในอัตราส่วนเอนไซม์ : กลีเซอรอล (2 : 1) เพื่อป้องกันการเสียดสภาพทางธรรมชาติ นำไปทำให้มีความเข้มข้นขึ้นโดยการคั่งน้ำออก โดยใช้ CM-cellulose ชนิดผงเพื่อนำไปหาปริมาณโปรตีนและความว่องไวของเอนไซม์ต่อไป

2.4.2 การแยกเอนไซม์โดยใช้เจลฟิลเตรชัน

คอลัมน์ขนาด 1.5 cm x 21 cm บรรจุด้วย Sephadex G-75 ที่แช่ให้พองแล้ว แล้วล้างคอลัมน์ด้วย 0.1 M Tris-HCl, pH 8.2 ปริมาตรไม่น้อยกว่า 3 เท่า ของปริมาตรคอลัมน์ ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้แยกเอนไซม์ต่อไป

ใส่เอนไซม์จากข้อ 2.4.1 ปริมาณโปรตีน 11 มิลลิกรัม ที่ทำให้เข้มข้นขึ้น ลงในคอลัมน์แล้วชะคอลัมน์ด้วย 0.1 M Tris-HCl, pH 8.2 ด้วยอัตราการไหล 18 มิลลิลิตร ต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 2 มิลลิลิตร ติดตามการแยกโปรตีน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนกระทั่งค่าที่อ่านได้เข้าใกล้ศูนย์ หรือไม่มีโปรตีนถูกชะออกมา จากข้อมูลการทดลองของสุริย์ (2539) ทำให้

พอทราบคร่าว ๆ ว่า หลอดใดควรจะมีความว่องไวของเอนไซม์ จึงเติมกลีเซอรอล 1 มิลลิลิตรในหลอดที่คาดว่าจะมีความว่องไวของเอนไซม์สูง เพื่อลดการเสียหายทางธรรมชาติ นำสารละลายในหลอดเหล่านี้ ไปตรวจหาความว่องไวของเอนไซม์ รวบรวมหลอดที่มีความว่องไวของเอนไซม์สูงมารวมกัน และทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการคั่งน้ำออกด้วย CM-cellulose ชนิดผง แบ่งไปหาปริมาณโปรตีน และความว่องไวของเอนไซม์ เพื่อตรวจสอบว่าเอนไซม์ที่แยกได้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นมากน้อยเพียงใด โดยการเทียบค่าความว่องไวจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์

2.4.3 การแยกเอนไซม์ในซี-ซีรัม โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

นำเอนไซม์ที่ได้ หลังจากที่ได้ผ่านขั้นตอนการแยกโปรตีนออกไปบางส่วนแล้วจากข้อ 2.4.2 ประมาณ 2.64 มิลลิกรัมนำไปแยกต่อโดยใช้อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบสภาพธรรมชาติ คัดแปลงจากวิธีของ Davis, (1968) ซึ่งใช้ โพลีอะคริลาไมด์เจล ความเข้มข้น 3.5% ใน 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8 เป็นเจลชั้นบน (stacking gel) และโพลีอะคริลาไมด์เจล ความเข้มข้น 7.5% ใน 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8 เป็นเจลสำหรับแยกสาร (separating gel) สำหรับบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส คือ 0.025 M Tris - 0.192 M glycine pH 8.3 ควบคุมกระแสไฟฟ้าให้คงที่ 120 มิลลิแอมแปร์ ใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง 30 นาที และนำแผ่นเจลที่ได้ไปตัดตามช่วงที่มีตัวอย่าง ให้เป็นแถบขนานกันตลอดโดยให้มีขนาด 1 มิลลิเมตร

ในการศึกษาครั้งนี้ได้รวมชั้นเจลแต่ละชั้น ที่มีตำแหน่งในช่วงการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) เดียวกัน จากแผ่นเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบสภาพธรรมชาติ จำนวน 6 แผ่น นำมาบดรวมกันใน 0.1 M Tris-HCl, pH 8.2 ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร นำสารละลายที่บดได้นำไปเซนตริฟิวจ์ ด้วยความเร็ว 2,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสที่ได้นำไปหาความว่องไวของเอนไซม์ แล้วจึงเลือกเอาเฉพาะส่วนใสที่มีความว่องไวสูงสุด แบ่งไปหาน้ำหนักโมเลกุลโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมี SDS อยู่ด้วย และนำไปฉีดกระตุ้น การสร้างแอนติบอดีในสัตว์ทดลองต่อไป

2.5 การหาความว่องไวของเอนไซม์จากตัวอย่างที่ได้จากน้ำยางพารา

การศึกษาความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ซึ่งเร่งปฏิกิริยา

$$\text{acetyl CoA} + \text{acetoacetyl CoA} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{ hydroxy - 3 - methylglutaryl -CoA} + \text{CoA}$$

โดยอาศัยสารกัมมันตรังสี ตามวิธีของ Miziorco, (1985) โดยใช้ ^{14}C - acetyl CoA เป็นสารตั้งต้นแล้ววัดปริมาณ ^{14}C - HMG-CoA ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาโดยตรง สารที่ใช้ในการศึกษาความว่องไวของเอนไซม์ ประกอบด้วย 0.1 M Tris- HCl, pH 8.2, 0.1 mM EDTA, 0.05 mM acetoacetyl CoA และสารละลายเอนไซม์ HMG- CoA synthase ที่ได้จากซี-ซีรัม หรือเอนไซม์ที่แยกได้ในขั้นตอนต่างๆ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วเติม ^{14}C - acetyl CoA (54.9 mCi/mmole) ให้มีความเข้มข้นเป็น 0.5 mM ปริมาตรรวมทั้งหมด 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วแบ่งสารผสมที่ได้ 40 ไมโครลิตร ใส่ในขวดแก้วที่บรรจุ 6 M HCl 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี นำไปอบที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เพื่อกำจัด ^{14}C - acetyl CoA ที่หลงเหลือในปฏิกิริยาให้หมดไป ให้เหลือเฉพาะ ^{14}C - HMG-CoA ที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา แล้วจึงเติมน้ำกลั่น 500 ไมโครลิตร เพื่อละลาย ^{14}C - HMG-CoA ที่แห้งติดอยู่กับขวดแก้ว เติมสารละลายที่ใช้สำหรับวัดสารกัมมันตรังสี (liquid scintillation cocktail) ซึ่งประกอบด้วย 75% xylene, 25% triton x - 114, 0.3% PPO และ 0.02 % dimethyl POPOP (Anderson and McClure, 1973) ปริมาตร 5 ml แล้วนำไปวัดค่า ^{14}C -HMG-CoA โดยใช้เครื่องวัดค่ากัมมันตภาพรังสี (Liquid Scintillation Counter; Beckman) เพื่อตรวจวัดปริมาณ ^{14}C - HMG-CoA ที่เป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาข้างต้น

ในการหาความว่องไวของสารตัวอย่าง ต้องทำการทดลอง โดยมีหลอดที่มีเอนไซม์ที่ต้มแล้ว เป็นตัวควบคุม และทำตามขั้นตอนการหาความว่องไวของเอนไซม์ตามขั้นตอนปกติทุกอย่าง จากนั้นนำค่าที่วัดได้มาหักลบออกจากค่าที่ได้จากหลอดที่มีเอนไซม์โดยไม่ต้ม ผลต่างนี้จะเป็นค่าของ ^{14}C -HMG-CoA ในปฏิกิริยา

2.6 การคำนวณหาความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase

ความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในปฏิกิริยาของ acetyl CoA + acetoacetyl CoA + H₂O → 3 hydroxy - 3 - methylglutaryl CoA + CoA โดยใช้ ¹⁴C- acetyl CoA เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ในปฏิกิริยา จะเห็นว่าในปฏิกิริยาดังกล่าว ¹⁴C- acetyl CoA 1 โมเลกุล จะถูกเปลี่ยนเป็น ¹⁴C- HMG-CoA 1 โมเลกุล เช่นกัน ในปฏิกิริยานี้ได้ใช้ ¹⁴C - acetyl CoA 54.9 mCi/mmole 5 ไมโครลิตร ผสมกับ acetyl CoA ที่มีใช้สารกัมมันตรังสี ความเข้มข้น 5 mM ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ดังนั้น radiospecificity ของ ¹⁴C - acetyl CoA ในสารละลายนี้คือ 80 μCi/mmole เพื่อความถูกต้องในการคำนวณหา radiospecificity ของ ¹⁴C - acetyl CoA ในสารละลายที่ใช้ในการทดลอง จึงได้ทำการวัดปริมาณสารกัมมันตรังสีของสารละลายที่ใช้ทำปฏิกิริยา 40 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย ¹⁴C - acetyl CoA และ ¹⁴C - HMG-CoA ที่เกิดขึ้นโดยไม่มีกรทำให้ ¹⁴C - acetyl CoA สลายตัวเป็น CO₂ เพื่อหาว่า acetyl CoA 5x10⁻⁵ mmole จะมี radioactivity กี่ dpm ประกอบการคำนวณหาความว่องไวของเอนไซม์ต่อไป การหา radiospecificity นี้ทำได้โดยนำสารละลายที่ทำปฏิกิริยา 40 ไมโครลิตร ใส่ในขวดแก้วเติมน้ำกลั่น 500 ไมโครลิตร และสารละลายที่ใช้สำหรับวัดสารกัมมันตรังสี 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่ากัมมันตภาพรังสี ปกติมักจะได้ค่าเฉลี่ย 3,256 dpm

ในกรณีของสารตัวอย่าง นำสารละลายที่ทำปฏิกิริยา 40 ไมโครลิตร ใส่ในขวดที่มี 6 M HCl 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปใส่ในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้ ¹⁴C-acetyl-CoA จากปฏิกิริยาให้สลายเป็น CO₂ แล้วจึงเติมน้ำกลั่น 500 ไมโครลิตร และเติมสารละลายที่ใช้สำหรับวัดสารกัมมันตรังสี 5 มิลลิลิตร นำไปวัดสารกัมมันตรังสี หากตัวอย่างเป็น ซี-ซีรัมซึ่งได้ค่าประมาณ 1,349 dpm และเพื่อความถูกต้องในการทดลองจึงต้องมีหลอดควบคุมซึ่งทำการทดลองเหมือนสารตัวอย่าง แต่ให้เอนไซม์ที่คัมในน้ำเดือดนาน 5 นาที มาทำปฏิกิริยา วัดค่ากัมมันตรังสีได้ประมาณ 173 dpm ในกรณีของ ซี-ซีรัม ในการ

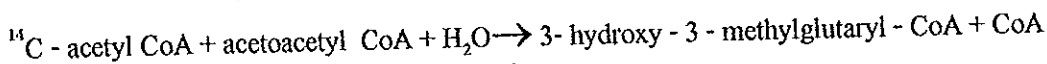
คำนวณจะต้องนำค่ากัมมันตภาพรังสีจากหลอดควบคุมไปหักลบออกจากค่าที่ได้จากการใช้สารละลายตัวอย่าง คือ 1,349 - 173 เท่ากับ 1,176 dpm

ตัวอย่างการคำนวณ

สารละลายในปฏิกิริยาที่มี ^{14}C - acetyl CoA 40 μl อ่านได้ = 3,256 dpm

สารละลายในปฏิกิริยาที่มี ^{14}C - acetyl Co A 100 μl อ่านได้ = $3,256 \times 100/40$ dpm
= 8140 dpm

ในสารละลายที่ทำปฏิกิริยา 100 μl มี acetyl CoA = 0.5 mM จะเกิด HMG-CoA = 0.5 mM ดังปฏิกิริยา



$$0.5 \text{ m M acetyl CoA มีเนื้อสาร} = 0.5 \text{ mmole/l} \\ = 0.5 \text{ } \mu\text{mole/ml}$$

$$\text{นั่นคือ } 1000 \text{ } \mu\text{l มีเนื้อสาร HMG-CoA} = 0.5 \text{ } \mu\text{mole}$$

$$100 \text{ } \mu\text{l มีเนื้อสาร HMG-CoA} = 0.5 \times 100/1000 \text{ } \mu\text{mole} \\ = 0.05 \text{ } \mu\text{mole}$$

ในการคำนวณนี้ถ้าจะให้ค่าถูกต้อง 100 % จะต้องนำปริมาณของ ^{14}C - acetyl CoA ที่อยู่ในปฏิกิริยารวมกับ acetyl CoA ธรรมดาโดยอาศัยข้อมูลของ ^{14}C - acetyl CoA (54.9 mCi/mmole) ที่ใช้ซึ่งมี ปริมาณสาร 0.364 $\mu\text{mole/ml}$ ที่ใช้ในการเตรียมสารละลาย ^{14}C - acetyl CoA โดยใช้ 5 μl ของ ^{14}C - acetyl CoA 0.364 $\mu\text{mole/ml}$ ผสมกับ 0.5 mM acetyl CoA 250 μl

$$\text{ในสารละลาย } 255 \text{ } \mu\text{l นี้จะมี acetyl CoA อยู่} = 1,250 + 1.82 \text{ n mole}$$

$$\text{ในสารละลาย } 1 \text{ } \mu\text{l นี้จะมี acetyl CoA อยู่} = 1,251.82 / 255 \text{ n mole}$$

$$\text{ในสารละลาย } 100 \text{ } \mu\text{l นี้จะมี acetyl CoA อยู่} = 490.91 \text{ n mole/100 } \mu\text{l}$$

จะเห็นได้ว่าปริมาณ acetyl CoA ที่มาจาก ^{14}C - acetyl CoA นั้น มีได้ทำให้

ความเข้มข้นของ acetyl CoA ในสารละลายเปลี่ยนแปลง อย่างมีนัยสำคัญ (500 nmole/100 μl กับ 490.91 nmole/100 μl) การศึกษานี้ต่างจากการศึกษาของผู้อื่นซึ่งใช้ ^{14}C - acetyl CoA โดยตรงในการทดลอง ส่วนการศึกษานี้ได้ทำให้สารกัมมันตรังสีลดลงไปประมาณ 50 เท่า ก่อนใช้สารละลายที่วัดค่ากัมมันตภาพรังสีได้

8,140 dpm มาจาก ^{14}C - acetyl CoA ที่อาจเปลี่ยนเป็น ^{14}C - HMG-CoA ได้เท่ากับ 0.05 μ mole หรือ 1 dpm มี ^{14}C ที่มาจาก ^{14}C - acetyl CoA ที่อาจเปลี่ยนเป็น ^{14}C - HMG-CoA ได้

$$\begin{aligned} &= 0.05 \times 1 / 8,140 \mu\text{mole} \\ &= 0.05 \times 10^3 / 8,140 \text{ nmole.} \\ &= 6.14 \times 10^{-3} \text{ nmole} \end{aligned}$$

นั่นคือ หากวัดค่ากัมมันตรังสีที่ได้จากการทดลองนี้ 1 dpm แสดงว่าปฏิกิริยาเกิด HMG-CoA 6.14×10^{-3} n mole จากตัวอย่างที่วัดค่ากัมมันตรังสีได้ 1,196 dpm จากสารละลาย 40 μ l

$$\begin{aligned} \text{สารละลาย } 40 \mu\text{l} \text{ วัดได้} &= 1,176 \text{ dpm} \\ 100 \mu\text{l} \text{ วัดได้} &= 1,176 \times 100 / 40 \text{ dpm} \\ &= 2,940 \text{ dpm} \end{aligned}$$

เมื่อนำมาคำนวณเป็น ^{14}C - HMG-CoA หน่วยเป็น nmole

$$\begin{aligned} 1 \text{ dpm เทียบได้กับ HMG-CoA} &= 6.14 \times 10^{-3} \text{ nmole} \\ 2,940 \text{ dpm เทียบได้กับ HMG-CoA} &= 6.14 \times 10^{-3} \times 2,940 \text{ nmole} \\ &= 18.05 \text{ nmole} \end{aligned}$$

HMG-CoA ที่เกิดขึ้นนี้ เกิดขึ้นภายในเวลา 2 นาที

$$\text{ดังนั้นสารตัวอย่างจึงมีความว่องไว} = 18.05 / 2 = 9.024 \text{ nmole/min}$$

$$\text{ปริมาณสารตัวอย่างที่ใช้} = 10 \mu\text{l}$$

$$\text{หากสารตัวอย่างนี้ คือ ซี-ซีรัม ที่มีปริมาณโปรตีน} = 13 \text{ mg/ml} = 0.13 \text{ mg/10 } \mu\text{l}$$

$$\text{ดังนั้นความว่องไวจำเพาะของ HMG-CoA synthase ใน ซี-ซีรัม} = 69.42 \text{ nmole/min/mg protein}$$

หมายเหตุ

ความว่องไวของเอนไซม์ บางครั้ง สามารถทราบได้คร่าวๆ โดยดูจากค่า dpm ที่ได้จากการอ่านของเครื่อง Liquid Scintillation Counter

2.7 การหาปริมาณโปรตีน

การหาปริมาณโปรตีนทำได้โดยใช้วิธีของ (Lowry, 1951) ซึ่งทำได้โดย นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายแอลคาไลน์คอปเปอร์ ซึ่งเตรียมได้จาก 2% Na_2CO_3 ใน 0.1 M NaOH, 0.5% CuSO_4 และ 2% $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ในอัตราส่วน 1 : 1 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันที หลังจากเติมสารละลายฟอลินทิ้งไว้ 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร คำนวณหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานที่เตรียมได้จากสารละลายโปรตีน BSA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2.8 การวิเคราะห์ค่า pI ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase

ในการศึกษาหาค่า pI (isoelectric point) ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ได้จากการสกัดเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแบบสภาพธรรมชาติ ว่ามีค่า pI เท่าไหร่ ทำได้โดยนำเอนไซม์ที่สกัดได้ไปหาค่า Isoelectric Focusing (IEF) ตามคู่มือของ BIO - RAD ซึ่งใช้สารประกอบของ 24.25% อะคริลามิเด, 0.75% บิสอะคริลามิเด, 0.1% ไโร โบฟลาวิน, 10% แอม โมเนียมเปอร์ซัลเฟต, 25% กลีเซอรอล, TEMED และ carrier ampholytes isoelectric focusing ที่มีค่า pH ระหว่าง 3.6 - 9.1 นำแผ่นเจลไปวางไว้ภายใต้แสงให้เกิด photopolymerization เป็นเวลา 45 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัวใส่สารละลายตัวอย่าง 1.5 ไมโครลิตรซึ่งมีปริมาณโปรตีน 1.3 ไมโครกรัม ลงบนแผ่นเจลทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อให้สารละลายตัวอย่างซึมเข้าไปในแผ่นเจล แล้วทำการแยกโปรตีนในสนามไฟฟ้าตามค่า pI ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเปลี่ยนกระแสไฟฟ้าเพิ่มขึ้นโดยใช้กระแสไฟฟ้า 200 โวลต์ เป็นเวลา 15 นาที และเพิ่มกระแสไฟฟ้าขึ้นไปอีกโดยใช้กระแสไฟฟ้า 450 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที นำแผ่นเจลที่ผ่านการแยกโปรตีนในสนามไฟฟ้าตามค่า pI ต่างๆ มาข้อมในสารละลายที่ประกอบด้วย สิวีสคิวมาซิบิล, ไอโซโพรพานอล, กรดอะซิติกในอัตราส่วน 1 : 7 : 3 โดยปริมาตร ที่มีคอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4) 0.5% ข้อมเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อมานำไปแช่ในสารละลายที่มีคอปเปอร์ซัลเฟต, ไอโซโพรพานอล และกรดอะซิติกในอัตราส่วน 1 : 5 : 12

โดยปริมาตรและในสารละลายที่มี ไอโซโทพานอล และกรดอะซิติกในอัตราส่วน 11 : 1 โดยปริมาตรเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐานที่มีค่า pI ต่างๆกันของ BIO - RAD (BIO - RAD ' s IEF standard)

2.9 การกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในสัตว์ทดลองต่อเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่แยกได้จากน้ำยางพารา

นำเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากซี-ซีรัม ที่ผ่านการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ ในขั้นตอน 2.4.3 แล้วนำเอนไซม์ที่เตรียมได้ ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 200 ไมโครกรัมผสม Complete Freud ' s Adjuvant 400 ไมโครลิตรและ 0.85% NaCl 400 ไมโครลิตร ให้เข้ากันดี ไปฉีดกระตุ้นกระต่ายน้ำหนักตัว 3 กิโลกรัม ใช้เข็มเบอร์ 25 โดยฉีดเข้าใต้ชั้นผิวหนังบริเวณคอ ฉีดกระตุ้นกระต่าย 7 วันต่อครั้ง (เดือนละ 4 ครั้ง) แต่แต่ละครั้งใช้เอนไซม์ ปริมาณ 200 ไมโครกรัมต่อตัว อาทิตย์ที่ 5 หลังจากฉีดกระต่ายเดือนแรก ทำการเจาะเลือดกระต่าย เพื่อนำไปศึกษาการตอบสนองทางอิมมูโนของกระต่ายต่อเอนไซม์ HMG-CoA synthase ส่วนการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในหนูทำเช่นเดียวกับกระต่าย แต่ฉีดเดือนละ 2 ครั้ง และเก็บเลือดเพื่อตรวจสอบการสร้างแอนติบอดี

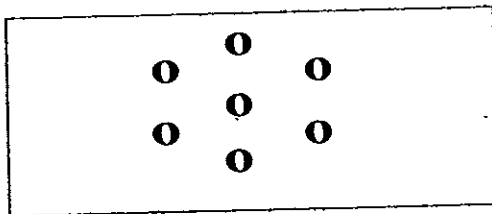
การเจาะเลือดกระต่ายและเก็บน้ำเลือด (ซีรัม) ทำโดยเจาะหลอดเลือดแดงบริเวณหู ด้วยเข็มเบอร์ 21 ปล่อยให้เลือดไหลออกมาเอง เก็บเลือดครั้งละประมาณ 5 มิลลิลิตร ต่อ ตัว นำเลือดที่ได้ วางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อให้เลือดแข็งตัว แล้วจึงนำไปปั่นด้วยความเร็ว 2,000 x g เป็นเวลา 15 นาที แยกเฉพาะส่วนน้ำเลือด (ส่วนใส) หรือซีรัม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และแบ่งไปตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีต่อเอนไซม์ HMG-CoA synthase ต่อไป

สำหรับการเก็บเลือดหนูทำได้โดยการตัดหางหนูประมาณ 0.5 เซนติเมตร แล้วจึงใช้หลอด eppendorf รองรับเลือดจากหางหนู เก็บเลือดได้ครั้งละประมาณ 200 ไมโครลิตร นำเลือดที่ได้วางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อให้เลือดแข็งตัว แล้วจึงนำไปปั่นด้วยความเร็ว 2,000 x g เป็นเวลา 15 นาที แยกเก็บส่วนใส (น้ำเลือด)

เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วแบ่งไปตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีต่อ เอนไซม์ HMG-CoA synthase ต่อไป

2.10 การตรวจสอบการสร้างแอนติซีรัม (antiserum) ต่อเอนไซม์ HMG-CoA synthase

การตรวจสอบแอนติซีรัมในสัตว์ทดลองทำได้โดยดูแถบเส้นตะกอนที่เกิดขึ้น จากปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีในแผ่นวุ้น โดยคัดแปลงจากวิธีของ Ouchterlony, (1949) เคลือบวุ้น (agar) บนแผ่นกระจกสไลด์ โดยนำ agar 1 กรัม ละลายใน 0.1 M borate buffer saline pH 7.8 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ซึ่งมี 1% NaN_3 ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำสารละลาย 3 มิลลิลิตร หยดลงบนกระจก สไลด์ขนาด 25 x 75 mm ให้กระจายทั่วแผ่นกระจกสไลด์อย่างสม่ำเสมอ ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที เอาไปวางในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จึงนำไปเจาะรูเอาวุ้นออก ดังรูปข้างล่างนี้



นำแอนติซีรัมที่ได้จากกระต่ายและหนู จำนวน 10 ไมโครลิตร หยดลงหลุม ตรงกลาง แล้วจึงใส่ ตัวอย่างต่าง ๆ หยดลงในหลุมต่างๆ ที่อยู่รอบหลุมของแอนติ ซีรัมไปวางไว้ใน petridish ใช้สำลีชุบน้ำพอมหมาดๆ ทำเป็นก้อน วางไว้ข้างๆ สไลด์ เพื่อไม่ให้เจลแห้ง ทิ้งไว้ค้างคืน สังเกตเส้นตะกอนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา ระหว่าง แอนติเจนและแอนติบอดี แล้วจึงนำมาข้อมโปรตีนด้วยสารละลายซึ่งประกอบด้วย 0.1% Coomassie brilliant blue R ในส่วนผสมของกรดอะซิติก : absolute ethanol : น้ำกลั่น 1 : 4.5 : 4.5 โดยปริมาตรทิ้งไว้ค้างคืน แล้วนำมาล้างเอาสีออกด้วยสาร

ละลาย ซึ่งประกอบด้วย กรดอะซิติก : absolute ethanol : น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1 : 4.5 : 4.5 โดยปริมาตร

2.11 ศึกษาเอนไซม์โดยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis แบบมี SDS อยู่ด้วย (SDS-PAGE)

การศึกษาความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้น โดยนำไปผ่านขั้นตอนต่างๆ เช่น CM-cellulose cation exchanger, เจลฟิลเตรชัน การแยกสารด้วยวิธี SDS-PAGE ซึ่งประกอบด้วยเจลชั้นบน และเจลแยกสาร ใช้โพลีอะครีลาไมด์เจล 8.75% ซึ่งมี SDS 0.1 ใน 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8 เป็นเจลชั้นบน ส่วนเจลชั้นล่างสำหรับแยกสารเป็นเจลที่มีความเข้มข้นของโพลีอะครีลาไมด์เจล แตกต่างกัน (gradient) ระหว่าง 7 - 15% ใน 0.1 SDS ใน 0.375 M Tris - HCl, pH 8.8 บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส คือ 0.25 M Tris - HCl, 0.192 M glycine และมี SDS 0.1% โดยดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli และ Favre (1973) นำสารตัวอย่างคัมรวมกับสารละลายของ 4% เบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล (2-mercaptoethanol), 4% SDS, 0.4% โบรโมฟินอลบลู และ 40% กลีเซอรอล ใน 0.2 M Tris - HCl, pH 6.8, 8 mM EDTA คัมในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที โดยใช้อัตราส่วนสารตัวอย่าง ต่อสารละลายผสมนี้ เท่ากับ 3 : 1 ควบคุมกระแสไฟฟ้าให้คงที่ 30 มิลลิแอมแปร์ จนกระทั่งสีของโบรโมฟินอลบลูเคลื่อนที่ไปเกือบสุดเจลใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที แล้วย้อมแผ่นเจลด้วยสีคูมาซีบลู, 0.2% ในสารละลายเมทานอล (methanol) : กรดอะซิติก : น้ำ ในอัตราส่วน 6 : 1 : 6 ทิ้งค้างคืน ล้างสีที่ไม่ได้จับกับโปรตีนออกด้วยสารละลายผสมของเมทานอล : กรดน้ำส้ม : น้ำ ในอัตราส่วน 5 : 7 : 88 โดยปริมาตร จนกระทั่งเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

นอกจากนี้ ยังหาน้ำหนักโมเลกุลของสาร ได้โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว 6 ตัว คือ ฟอสโฟริเลส บี (phosphorylase b, MW. = 94,000 คาลตัน), โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin, MW. = 20,000 คาลตัน), อัลบูมินจากไข่ (ovalbumin, MW. = 43,000 คาลตัน), คาร์บอนิก แอนไฮเดรส (carbonic anhydrase, MW. = 30,000 คาลตัน), ทริปซินอินฮิบิเตอร์ (trypsin

inhibitor, MW. = 20,000 คาลตัน), และแอลฟา-แลคตัลบูมิน (α -lactalbumin, MW. = 14,000 คาลตัน) วัดระยะทาง ที่โปรตีนเคลื่อนที่ได้กับระยะทางที่แยกได้ของ โปรตีนมาตรฐานและโบรโมเฟีนอลบลู นำมาหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ โดยการ

$$\text{เคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility)} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีน}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโบรโมเฟีนอลบลู}}$$

การหาน้ำหนักหน่วยย่อย หาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ แล้วนำค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ และ \log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิดมาเขียนกราฟโปรตีนมาตรฐาน จากนั้นนำค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase มาคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐาน

2.12 การศึกษาสเปกตรัมของเอนไซม์ HMG-CoA synthase

ศึกษาสเปกตรัมของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่แยกได้จากยางพาราที่ผ่านขั้นตอนการสกัดเจลาจากอิเล็กโทรโฟเรซิสแบบสภาพธรรมชาติ ที่มีความว่องไวสูงสุด จากข้อ 2.4.3 นำมาศึกษาการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 200 นาโนเมตร ถึง 350 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องดูดกลืนแสงของ Shimadzu รุ่น UV 160A

2.13 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความว่องไวของเอนไซม์

2.13.1 อิทธิพลของ L-659, 699 ต่อความว่องไวของเอนไซม์

สุริย์, (2539) ได้ศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ทั้งที่เป็นเอนไซม์จาก ซี-ซีรัมและเอนไซม์ที่ได้จากเจลฟิลเตรชัน ในขั้นตอนการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ พบว่าการทำงานของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น pH, อุณหภูมิ, เกลือ และไอออนโลหะต่างๆ ซึ่งล้วนแต่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase, L-659, 699 ซึ่งเป็นสารประกอบชนิดหนึ่งที่สามารถยับยั้งความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในตับหนู (Greenspan *et al.*, 1987) ในการศึกษาครั้งนี้จึงศึกษาผลของ L-659, 699 ที่ความ

เข้มข้นต่างๆกัน ต่อความว่องไวของเอนไซม์จากซี-ซีรัม และเอนไซม์ที่ได้จากเจลฟิลเตรชัน (Sephadex G-75) ในขั้นตอน จากข้อ 2.4.3 โดยศึกษาถึงผลของ L-659, 699 ให้มีความเข้มข้นต่างๆกัน คือ (10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M) ต่อความว่องไวของเอนไซม์ โดยการศึกษาหาความว่องไวของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 2.5

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาอิทธิพลของตัวทำละลายคือ DMSO ซึ่งใช้ในการละลาย L-659, 699 โดยทำการทดสอบความว่องไวของเอนไซม์ ตามวิธีการในข้อ 2.5 ในสถานะที่ไม่มี DMSO เปรียบเทียบกับที่มี DMSO อยู่เป็น 10 และ 25% โดยปริมาตร ตามลำดับ

2.13.2 อิทธิพลของ acetoacetyl CoA ต่อความว่องไวของเอนไซม์

จากการศึกษาของ Suvachittanont และ Wititsuwannakul, (1995) พบว่า HMG-CoA synthase ในซี-ซีรัมสามารถทำงานได้แม้จะไม่มี acetoacetyl CoA นอกจากนี้ สุริย์ (2539) พบว่า acetoacetyl CoA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ไม่มีผลต่อความว่องไวของเอนไซม์ทั้งในซี-ซีรัมและเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์แล้ว จากขั้นตอนการทำเจลฟิลเตรชัน เพราะไม่ว่าจะใช้ความเข้มข้นของ acetoacetyl CoA มากน้อยเพียงใด ความว่องไวของเอนไซม์ก็ยังคงไม่ต่างกันมากนัก

ดังนั้นเพื่อเป็นการพิสูจน์ว่า ความว่องไวของเอนไซม์ที่ได้จากการสกัดเจล โดยวิธีในข้อ 2.4.3 ยังคงทำงานได้แม้จะไม่มี acetoacetyl CoA จึงได้ทำการวิเคราะห์ความว่องไวของเอนไซม์สกัดที่ได้เปรียบเทียบกับตามวิธีในข้อ 2.5

2.13.3 อิทธิพลของแอนติบอดีจากกระต่าย ต่อความว่องไวของเอนไซม์

เมื่อนำเอนไซม์สกัด HMG-CoA synthase จากเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสแบบสภาพธรรมชาติและฉีดกระตุ้นในกระต่าย ตามวิธีในข้อ 2.8 สามารถสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจน (เอนไซม์ HMG-CoA synthase) จึงได้นำแอนติบอดีที่อยู่ในซี-ซีรัมจากกระต่ายนี้ มาศึกษาว่าจะมีบทบาทในการจับกับเอนไซม์และทำการศึกษาหาความว่องไวของเอนไซม์ในสารละลายผสมระหว่างเอนไซม์จาก ซี-ซีรัมของน้ำยาพารา

ของน้ำยารักษา และแอนติบอดี จาก ซีรัม กระจายในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร ตามรายละเอียดเกี่ยวกับการหาความไวของเอนไซม์ในข้อ 2.5

2.14 การหาปริมาณเอนไซม์ HMG-CoA synthase โดย Enzyme - linked-Immunesorbent assay (ELISA)

ELISA เป็นเทคนิคที่สามารถตรวจหาสารชีวโมเลกุลที่มีปริมาณน้อยๆ ได้อย่างถูกต้อง และมีความไวในการตรวจสอบทัดเทียมกับ radioimmunoassay (RIA) สามารถทำได้โดยใช้อุปกรณ์น้อย ไม่ต้องใช้สารกัมมันตรังสี โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ซึ่งจะมีการทำปฏิกิริยาจับกันอย่างจำเพาะและตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยานี้โดยการสีทึบโดยวิธีนี้ ทำการตรวจสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารตัวอย่างที่มี HMG-CoA synthase และปริมาณแอนตี้ซีรัม ต่อ HMG-CoA synthase ที่เหมาะสมในการหาปฏิกิริยารวมทั้งความเข้มข้นของ antirabbit IgG peroxidase conjugate ที่เหมาะสม โดยการทำ checkerboard titration การตรวจหาปริมาณสารในตัวอย่างโดย ELISA (Voller *et al.*, 1976) สามารถทำได้ 3 วิธี คือ

วิธีที่ 1 การฉายเพลทด้วยแอนติเจน

วิธีการนี้เริ่มจากการใช้แอนติเจน (เอนไซม์ HMG-CoA synthase) ปริมาณต่างๆกัน ฉายเพลทไว้ ล้างส่วนเกินออก ใส่แอนติบอดีต่อเอนไซม์ซึ่งได้จากซี-ซีรัมลงไป เพื่อให้แอนติเจนและแอนติบอดีทำปฏิกิริยากันแบบจำเพาะในเพลท แล้วจึงเติมแอนติบอดีตัวที่สอง เพื่อจับกับแอนติบอดีที่จับอยู่กับแอนติเจนในเพลท ล้างเพลทด้วย PBS - Tween เติมซับสเตรท (substrate) ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพื่อทำปฏิกิริยาเป็นสีส้ม ความเข้มของสีจะขึ้นอยู่กับปริมาณแอนติบอดีที่จับแบบจำเพาะกับแอนติเจนในเพลท วิธีการนี้มีขั้นตอนดังนี้

1. นำสารละลายแอนติเจน (ซี-ซีรัม ที่มีเอนไซม์ HMG-CoA synthase อยู่ด้วย) มาทำให้มีความเข้มข้นต่างๆคือ 1 : 1000, 1 : 500, 1 : 100, 1 : 50 และ 1 : 10 ตามลำดับ ใน coating buffer ใส่ลงในเพลท หลุมละ 100 ไมโครลิตร เก็บค้างคืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้แอนติเจนหรือเอนไซม์จับกับเพลท
2. ล้างเพลทด้วย PBS - Tween จำนวน 5 ครั้ง เพื่อล้างส่วนที่ไม่ได้จับกับเพลทออกไป
3. เติมแอนติบอดีต่อเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆคือ 1 : 200, 1 : 500, 1 : 1,000 ใน PBS - Tween หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้นาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีที่จะใช้ในการหาปริมาณเอนไซม์
4. ล้างเพลทด้วย PBS - Tween จำนวน 5 ครั้ง
5. เติมเปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต (anti - rabbit Ig G Peroxidase conjugate) ที่เจือจาง 1 : 1,000 ใน PBS - Tween หลุมละ 10 ไมโครลิตรทิ้งไว้นาน 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
6. ล้างเพลทด้วย PBS - Tween จำนวน 5 ครั้ง เพื่อขจัดส่วน anti-rabbit Ig G peroxidase conjugate ส่วนเกินออก
7. เติมซับสเตรท ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (*o*-dianisidine) ความเข้มข้น 0.05% ในสารละลายผสมปริมาตร 100 มิลลิลิตรของ เมทานอล 16.7 มิลลิลิตร, 50 mM acetate buffer pH 5.4 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร, น้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.17 มิลลิลิตร นำสารละลายผสมที่ได้ใส่ลงในหลุมๆละ 100 ไมโครลิตร
8. สังเกตสีที่เกิดขึ้นของปฏิกิริยา
9. อ่านค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละหลุมที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร เทียบกับหลุมควบคุม ซึ่งเคลือบด้วย coating buffer

วิธีที่ 2 การฉายเพลทด้วยแอนติบอดี

วิธีการนี้หาแอนติเจน โดยใช้แอนติบอดี ต่อเอนไซม์ HMG-CoA synthase ฉายเพลท ทิ้งไว้ค้างคืน แล้วจึงใช้แอนติเจน (HMG-CoA synthase) ใน coating buffer

เติมลงไปเพื่อให้มีการจับกันแบบจำเพาะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี แล้วจึงเติมแอนติบอดีตัวที่สอง (anti-rabbit Ig G Peroxidase) เพื่อให้จับกับแอนติบอดีที่จับจำเพาะอยู่กับแอนติเจน เมื่อเติมซับสเตรทลงไปเพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาได้สารที่มีสีเกิดขึ้นและความเข้มของสีขึ้นอยู่กับปริมาณแอนติเจนที่จับอยู่กับแอนติบอดีบนเพลท โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. นำแอนติบอดีต่อเอนไซม์ HMG-CoA synthase เจือจางใน coating buffer ในอัตราส่วน 1 : 500 ใส่ลงในเพลท หลุมละ 100 ไมโครลิตร เก็บค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้แอนติบอดีเกาะกับเพลท
2. ล้างเพลทด้วย PBS - Tween จำนวน 5 ครั้ง
3. นำสารละลายแอนติเจน (ซี-ซีรัมที่มีเอนไซม์ HMG-CoA synthase อยู่ด้วย) มาทำให้มีความเข้มข้นต่างๆ คือ 1 : 1,000, 1 : 500, 1 : 100, 1 : 50 และ 1 : 10 ตามลำดับใน coating buffer ใส่ลงในเพลท หลุมละ 100 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในเพลท
4. ล้างเพลทด้วย PBS - Tween จำนวน 5 ครั้ง
5. เติม anti - rabbit Ig G peroxidase conjugate เจือจางใน PBS - Tween ในอัตราส่วน 1 : 1000 ใส่ลงในเพลท หลุมละ 100 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้จับแอนติบอดีที่จับอยู่กับเอนไซม์
6. ล้างเพลทด้วย PBS - Tween จำนวน 5 ครั้ง
7. เติมซับสเตรทของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ซึ่งมี *o*-dianisidine ละลายในบัฟเฟอร์เช่นเดียวกับวิธีที่ 1 หลุมละ 100 ไมโครลิตร
8. สังเกตสีที่เกิดขึ้นของปฏิกิริยา หรือวัดค่าการดูดกลืนแสงโดย ELISA reader

วิธีที่ 3 การฉาบเพลทด้วยสารละลายผสมระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี

วิธีการหาแอนติเจนโดยใช้แอนติบอดี ต่อเอนไซม์ HMG-CoA synthase ฉาบเพลท ทิ้งไว้ค้างคืน แล้วจึงเติมสารละลายผสมระหว่าง แอนติบอดีตัวที่สอง และแอนติเจน หรือสารที่มีเอนไซม์ HMG-CoA synthase อยู่ด้วย เพื่อให้แอนติเจนจับกับ

แอนติบอดีอย่างจำเพาะ โดยมี แอนติบอดีตัวที่สอง เป็นแอนไซม์ที่มีการติดฉลากเมื่อเติมแอนไซม์ซับสเตรท เพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาเป็นสี สัมความเข้มของสีจะขึ้นอยู่กับปริมาณแอนติเจน ที่จับแบบจำเพาะกับแอนติบอดีอยู่ในเพลท ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. นำแอนติบอดีต่อแอนไซม์ HMG-CoA synthase เจือจางใน coating buffer ในอัตราส่วน 1 : 200 ใส่ลงในเพลท หลุมละ 200 ไมโครลิตร เก็บค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. ล้างเพลทด้วย PBS - Tween จำนวน 5 ครั้ง

3. นำแอนติเจน (HMG-CoA synthase ที่มีอยู่ในซี-ซีรัมของน้ำยางพารา) ผสมรวมกับ anti - rabbit Ig G peroxidase conjugate อัตราส่วน 1 : 1 แล้วนำมาเจือจางใน PBS - Tween ในอัตราส่วน 1 : 1,000, 1 : 500, 1 : 100, 1 : 50, 1 : 25 และ 1 : 10 ตามลำดับ วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

4. นำสารละลายที่ได้ใส่ลงในเพลท หลุมละ 200 ไมโครลิตรวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

5. ล้างเพลทด้วย PBS - Tween จำนวน 5 ครั้ง

6. เติมซับสเตรทของแอนไซม์ HMG-CoA synthase เช่นเดียวกับวิธีที่ 1

7. สังเกตสีที่เกิดขึ้นของปฏิกิริยา หรือ วัดค่าการดูดกลืนแสงโดย ELISA reader

วิธีนี้จะมีหลักการคล้ายคลึงกับวิธีที่ 2 แต่แตกต่างกันเล็กน้อย โดยที่แอนติเจน หรือ แอนไซม์ HMG-CoA synthase และ แอนติบอดีตัวที่สอง ถูกเติมลงไปพร้อมๆ กันในรูปของของผสม

นอกจากจะนำแอนติบอดีจากซีรัมกระต่าย ไปใช้ในการหาปริมาณแอนไซม์ โดย ELISA แล้วยังอาจนำแอนติบอดีที่ได้ไปใช้ตรวจหาแอนไซม์ในสารตัวอย่างซึ่งผ่านการแยกโปรตีนโดยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิสแบบมี SDS อยู่ด้วยและถ่ายโปรตีนลงบนแผ่น nitrocellulose และตรวจสอบโปรตีนที่ถ่ายลงบนแผ่น nitrocellulose โดยวิธีที่เรียกว่า Western blot ได้อีกด้วย

2.15 Western blot

เมื่อซีรัมกระต่ายมีแอนติบอดีต่อเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่แยกได้จาก ซี-ซีรัมของยางพาราแล้ว นำแอนติบอดีที่เตรียมได้ไปใช้ในการตรวจหาโปรตีนที่แยกได้ซึ่งอยู่ในแผ่นเจลไปสู่แผ่น nitrocellulose โดยใช้เครื่องถ่ายโปรตีน ถ่ายโปรตีนจากเจลไปยังแผ่น nitrocellulose โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ หรือ 400-500 mA เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส หลังจากการถ่ายโปรตีนที่แยกได้จากเจลลงสู่แผ่น nitrocellulose แล้วตรวจสอบการถ่ายโปรตีนจากเจลว่าเกิดขึ้นสมบูรณ์หรือไม่โดยการย้อมสีโปรตีนในเจลด้วยสีย้อมคามาซีบลู หากการถ่ายเกิดขึ้นสมบูรณ์ แผ่นเจลจะไม่ติดสีย้อม หลังจากนั้นตรวจสอบความีโปรตีนอยู่ในแผ่น nitrocellulose หรือไม่ โดยการย้อมด้วยสารละลาย Ponceau S 0.2% ใน 10% กรดอะซิติก เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำแผ่น nitrocellulose มาตรวจสอบว่ามีโปรตีนที่มีลักษณะเป็นเอนไซม์หรือไม่ โดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์กับแอนติบอดีต่อเอนไซม์ โดยล้างแผ่น nitrocellulose ด้วย phosphate buffer saline ซึ่งประกอบด้วย 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 0.2 g KH_2PO_4 และ 2 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ และ 0.2 g ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำแผ่น nitrocellulose มาใส่ในสารละลาย blocking reagent ที่ประกอบด้วย 3 % BSA ใน Tris buffer saline (TBS) เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำแผ่น nitrocellulose นี้มาใส่ในสารละลายแอนติบอดีที่ได้จากซีรัมกระต่ายที่เตรียมได้โดยใช้ 20 μl ของซีรัมในสารละลาย 1% BSA ใน TBS ซึ่งประกอบด้วย Tris 2.42 g, glycine 17 g และ NaN_3 0.4 g ในสารละลายน้ำกลั่น 2,000 มิลลิลิตร ทิ้งค้างคืนไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ในตู้เย็น จากนั้นนำแผ่น nitrocellulose มาล้างด้วย 0.3% Tween 20 ใน TBS เป็นเวลา 20 นาที 3 ครั้ง และใน TBS 10 นาที 3 ครั้ง

นำแผ่น nitrocellulose ที่ล้างแอนติบอดีจากซีรัมกระต่ายต่อเอนไซม์ HMG-CoA synthase ออกไปแล้ว มาใส่ในสารละลายแอนติบอดีตัวที่สอง ซึ่งประกอบด้วย anti-rabbit Ig G ที่เชื่อมด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ใน 1% BSA, TBS 10 ml เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เสร็จแล้วล้าง 3 ครั้ง

ครั้งละ 20 นาที และอีก 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที เช่นเดียวกับการล้างสารละลายแอนติบอดีจากกระดาษในขั้นตอนต้น

จากนั้นนำไปย้อมด้วยสารละลายที่ประกอบด้วย *o*-dianisidine 0.5 กรัม, เมทิลแอลกอฮอล์ 16.7 ml และ 50 mM acetate buffer 30 ml, H₂O 50 ml และ H₂O₂ 2 μ l สังเกตแถบสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น แถบนี้จะเป็นตัวบ่งชี้ว่ามีโปรตีนที่มีลักษณะเป็นเอนไซม์ HMG-CoA synthase อยู่ในสารตัวอย่าง

3. ผลการทดลอง

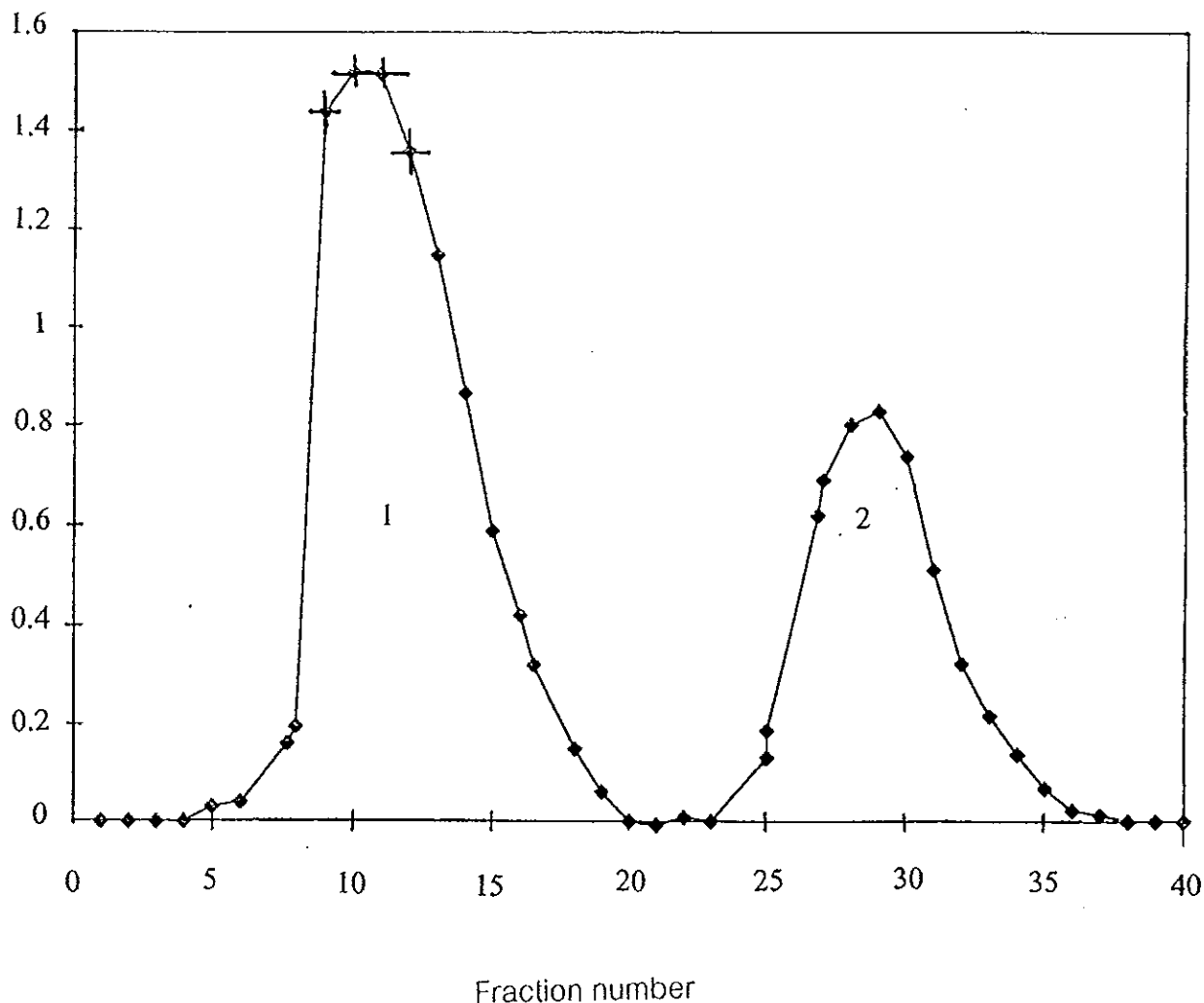
3.1 การแยกเอนไซม์จากซี-ซีรัมให้บริสุทธิ์

ในการแยกเอนไซม์จากซี-ซีรัม พบว่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากซี-ซีรัมของน้ำยางพารา มีค่า 19.8 nmole/min/mg protein แล้วจึงนำซี-ซีรัมที่ได้ไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการคั่งน้ำออกด้วย CM-cellulose ชนิดผง ความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์มีค่า 16.4 nmole/min/mg protein ซึ่งมีความบริสุทธิ์ลดลง 0.83 เท่า ดังตารางที่ 1 และเมื่อนำซี-ซีรัมที่เข้มข้นขึ้นผ่าน CM-cellulose cation exchanger พบว่าเอนไซม์ HMG-CoA synthase ไม่จับกับ CM-cellulose cation exchanger จึงแยกเอาโปรตีนอื่นๆที่จับอยู่กับ CM-cellulose cation exchanger ออก แล้วจึงเก็บส่วนใส มาหาความว่องไวของเอนไซม์ มีค่า 26.8 nmole/min/mg protein มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น 1.36 เท่า และมีเอนไซม์อยู่ร้อยละ 56.4 ดังตารางที่ 1 แล้วจึงนำเอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอน CM-cellulose cation exchanger มาทำให้เข้มข้นขึ้น พบว่ามีความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ 22.2 nmole/min/mg protein และมีความบริสุทธิ์สูงขึ้น 1.12 เท่า และมีเอนไซม์อยู่ร้อยละ 19.2 ดังตารางที่ 1 หลังจากนั้นจึงนำเอนไซม์ดังกล่าวผ่านเจลฟิลเตรชัน (Sephadex G-75) พบว่า มีความว่องไวจำเพาะ 101.9 nmole/min/mg protein และมีความบริสุทธิ์สูงขึ้น 5.16 เท่า และมีเอนไซม์อยู่ร้อยละ 17.9 ดังตารางที่ 1 ผลการแยกโปรตีนอื่นๆออกจากเอนไซม์ HMG-CoA synthase โดยใช้ เจลฟิลเตรชัน ในการศึกษานี้ได้ทำการแยกเอนไซม์หลายครั้ง และส่วนใหญ่จะมีลักษณะการแยกโปรตีนดังรูปที่ 9 โดยความว่องไวสูงสุดของเอนไซม์จะอยู่ที่ พีคที่ 1 หรือบริเวณที่โปรตีนมีขนาดใหญ่กว่า

ตารางที่ 1 การแยกเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากซี-ซีรัมให้บริสุทธิ์ขึ้น เริ่มต้น
จากซี-ซีรัม 80 มิลลิลิตรและผ่านขั้นตอนต่างๆตามลำดับ

ขั้นตอนการทำ ให้บริสุทธิ์	ความว่องไว (nmole/min)	โปรตีน (mg)	ความว่องไว จำเพาะ (nmole/min/mg protein)	ความ บริสุทธิ์ (เท่า)	ปริมาณ สุทธิ (ร้อยละ)
ซี-ซีรัม	5,974	302	19.8	1	100
ซี-ซีรัมที่ทำให้ เข้มข้นขึ้น	3,507	214	16.4	0.83	58.7
CM-cellulose cation exchanger	3,368	126	26.8	1.36	56.4
ทำให้เข้มข้น ก่อนนำไปทำ เจลฟิเตรชัน	1,149	52	22.2	1.12	19.2
เจลฟิเตรชัน (Sephadex G-75)	1,070	11	101.9	5.16	17.9

OD.280



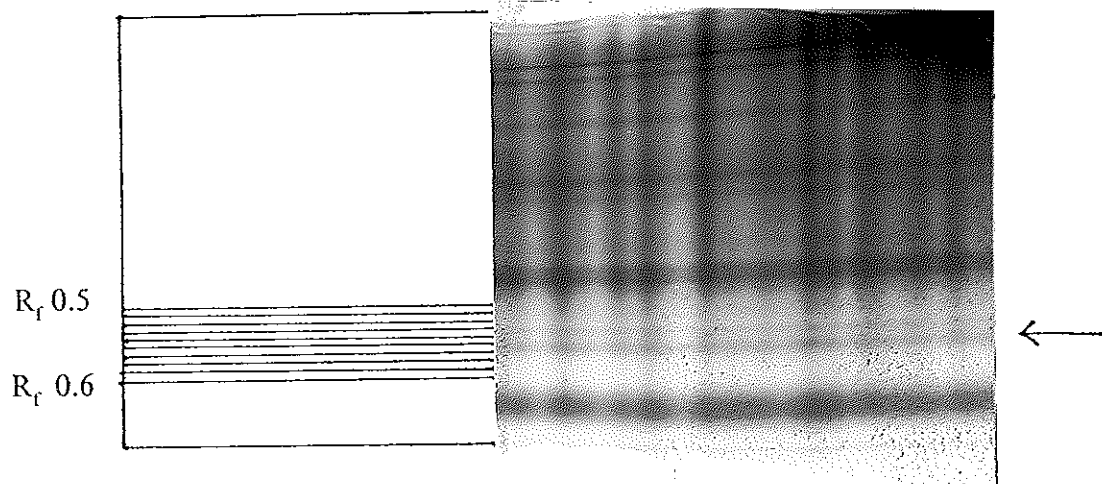
รูปที่ 8 การทำเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากซี-ซีรัมให้บริสุทธิ์โดยโครมาโตกราฟีบนคอลัมน์ Sephadex G-75 ขนาด 1.5 x 21 cm. โดยนำโปรตีนที่ผ่านการแยกด้วย CM-cellulose cation exchanger แล้วทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ CM-cellulose ชนิดผงจากนั้นนำไปแยกด้วย Sephadex G-75 ะโปรตีนในคอลัมน์ด้วย 0.1M Tris-HCl, pH 8.2 ด้วยอัตราเร็ว 18 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 2 มิลลิลิตร พบเอนไซม์ส่วนใหญ่ในพีคที่ 1

****หมายเหตุ****

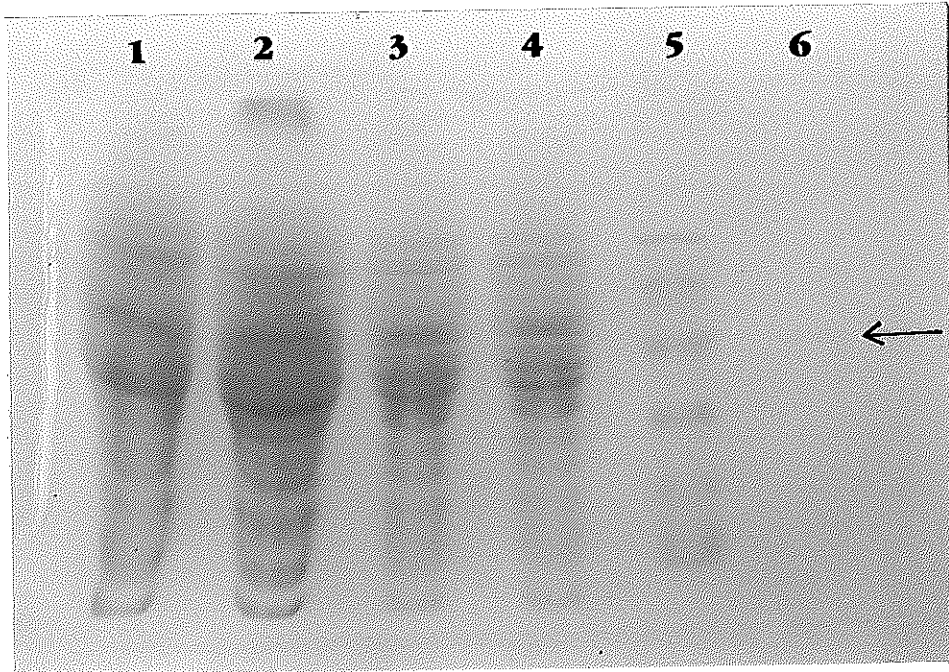
+ คือ หลอดที่มีความว่องไวของเอนไซม์สูง

3.2 ลักษณะของเอนไซม์ที่แยกได้

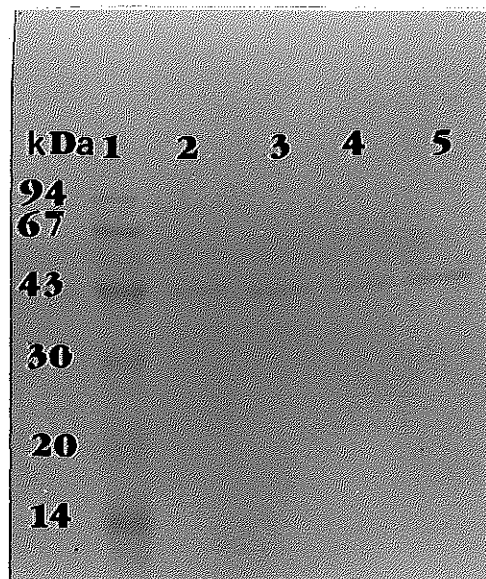
การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้นในขั้นตอนต่างๆในหัวข้อ 2.4 ถึง 2.4.3 พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น ประมาณ 5 เท่า กล่าวคือ มีความว่องไวจำเพาะเพิ่มขึ้น จาก 19.8 nmole/min/mg protein ถึง 101.9 nmole/min/mg protein ซึ่งเมื่อนำเอนไซม์ที่แยกได้ในขั้นตอนเหล่านั้นไปศึกษาอิเล็กโทรโฟเรซิสแบบสภาพธรรมชาติ (native PAGE) พบว่าเอนไซม์ที่แยกได้ในขั้นตอนต่างๆ ดังกล่าว ประกอบไปด้วยโปรตีนมากมายหลายชนิดปนกันอยู่ จึงได้นำเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นแล้วบางส่วน ไปแยกโดยอาศัยความแตกต่างในสนามไฟฟ้า และข้อมลิตูมาซีบลูจากลิตูม พบว่ายังมีโปรตีนปนกันอยู่หลายชนิดดังจะเห็นได้จากแถบโปรตีนเคลื่อนที่จากจั่วลบมายังจั่วบวกได้ไกลเป็นระยะทางแตกต่างกัน แสดงว่าโปรตีนส่วนใหญ่มีประจุลบมาก-น้อยแตกต่างกันด้วย และเมื่อนำเจลที่ยังไม่ได้ข้อมตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 1 มิลลิเมตร ดังรูปที่ 9 แล้วสกัดเอนไซม์ด้วย 0.1 M Tris-HCl, pH 8.2 นำไปตรวจสอบดูว่า เอนไซม์อยู่ตรงส่วนใดของเจล พบว่าความว่องไวของเอนไซม์จะอยู่ในช่วง R_f 0.5-0.6 และหากนำเจลที่แยกเอนไซม์โดยอาศัย PAGE แล้วตัดเฉพาะแถบที่มีความว่องไวของเอนไซม์ มาศึกษาเพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ และหาน้ำหนักโมเลกุลโดย SDS-PAGE เอนไซม์นี้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น ดังจะเห็นได้จากการปรากฏแถบเนื่องจากการข้อมโปรตีนชัดเจนเพียงแถบเดียว ดังรูปที่ 10 และ 11



รูปที่ 9 การย้อมโปรตีนและลักษณะการตัดเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแบบสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาบ้างแล้ว จนถึงขั้นผ่าน Sephadex G-75



- รูปที่ 10 แสดงการแยกโปรตีนด้วยประจุไฟฟ้าแบบ SDS-PAGE ของเอนไซม์ที่ได้จากขั้นตอนการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ต่างๆ
- ช่องที่ 1 ซี-ซีรัมจากน้ำยางพารา มีปริมาณโปรตีน 94 ไมโครกรัม
- ช่องที่ 2 ซี-ซีรัมที่ทำให้เข้มข้น มีปริมาณโปรตีน 134 ไมโครกรัม
- ช่องที่ 3 ซี-ซีรัมที่ผ่าน CM-cellulose มีปริมาณโปรตีน 83 ไมโครกรัม
- ช่องที่ 4 ซี-ซีรัมที่ผ่านเจลฟิลเตรชันและทำให้เข้มข้น มีปริมาณโปรตีน 69 ไมโครกรัม
- ช่องที่ 5 โปรตีนมาตรฐาน
- ช่องที่ 6 เอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ได้จากการสกัดเจล มีปริมาณโปรตีน 16 ไมโครกรัม



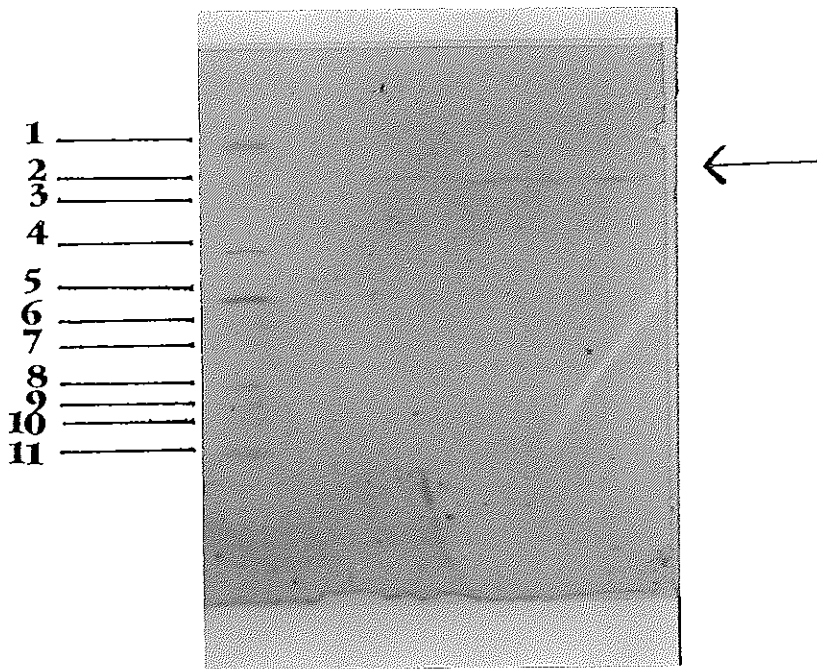
รูปที่ 11 การกระจายของเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากซี-ซีรัมของน้ำยางพารา
 ที่ผ่านการสกัดเจลใน SDS-PAGE อิเล็กโทรโฟรีซิส
 ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน
 ช่องที่ 2-5 เอนไซม์ HMG-CoA synthase จากการสกัดเจลมีปริมาณ โปรตีน
 16 ไมโครกรัม

3.3 ค่า pI ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase

ผลการวิเคราะห์ค่า Isoelectric point หรือ pH ที่โปรตีนมีประจุเป็นศูนย์ (pI) ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่สกัดได้จากเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแบบสภาพธรรมชาติ โดยการทำให้ Isoelectric focusing เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบค่า pI วิธีการในหัวข้อ 2.7 พบว่าเอนไซม์สกัดนี้มีแถบโปรตีน 1 แถบ มีค่า pI ประมาณ 4.6 เมื่อเทียบกับค่า pI ของสารมาตรฐาน ดังรูปที่ 12 ผลการศึกษา pI ยังช่วยบ่งชี้ว่าเอนไซม์ที่เราแยกได้นี้ค่อนข้างบริสุทธิ์ และจะมีประจุเป็นลบ เคลื่อนที่ไปหาขั้วบวก

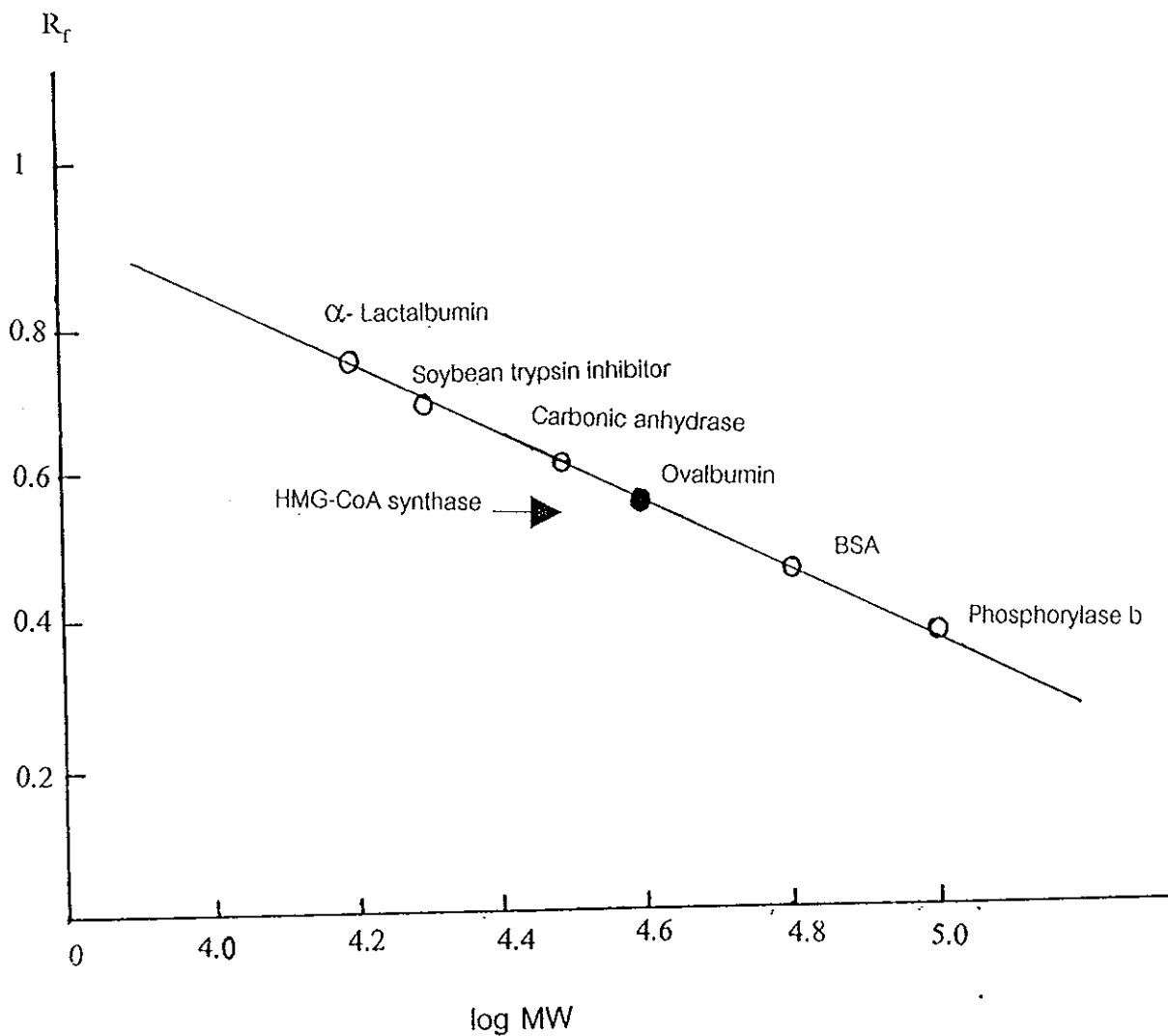
3.4 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ HMG-CoA synthase โดยวิธี SDS-PAGE

เมื่อนำเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากการสกัดเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแบบสภาพธรรมชาติ และมีความว่องไวของเอนไซม์สูงสุดมาหาน้ำหนักโมเลกุล โดยวิธี SDS-PAGE ตามรายละเอียดของวิธีการซึ่งระบุไว้ในหัวข้อ 3.10 พบว่า มีแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว (ดังรูปที่ 10 และ 11) ซึ่งสามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลได้ เท่ากับ 43,000 ดาลตัน โดยการเปรียบเทียบ ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ หรือ R_f ของเอนไซม์ ดังกล่าวกับกราฟระหว่างค่า R_f ของแถบโปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิด คือ ฟอสฟอรีเลสบี, โบวินซีรัมอัลบูมิน, โอวัลบูมิน, คาร์บอนิกแอนไฮเดรส, ซอยบีนทริปซินอินฮิบิเตอร์ และ แอลฟา-แลคตัลบูมิน กับค่า \log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแต่ละชนิด ในรูปที่ 13



รูปที่ 12 การเคลื่อนที่ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นใน
ขั้นตอนการสกัดจากอวัยวะโทรโพเรซิสแบบสภาพธรรมชาติเปรียบเทียบกับ
โปรตีนมาตรฐานที่ทราบค่า pI

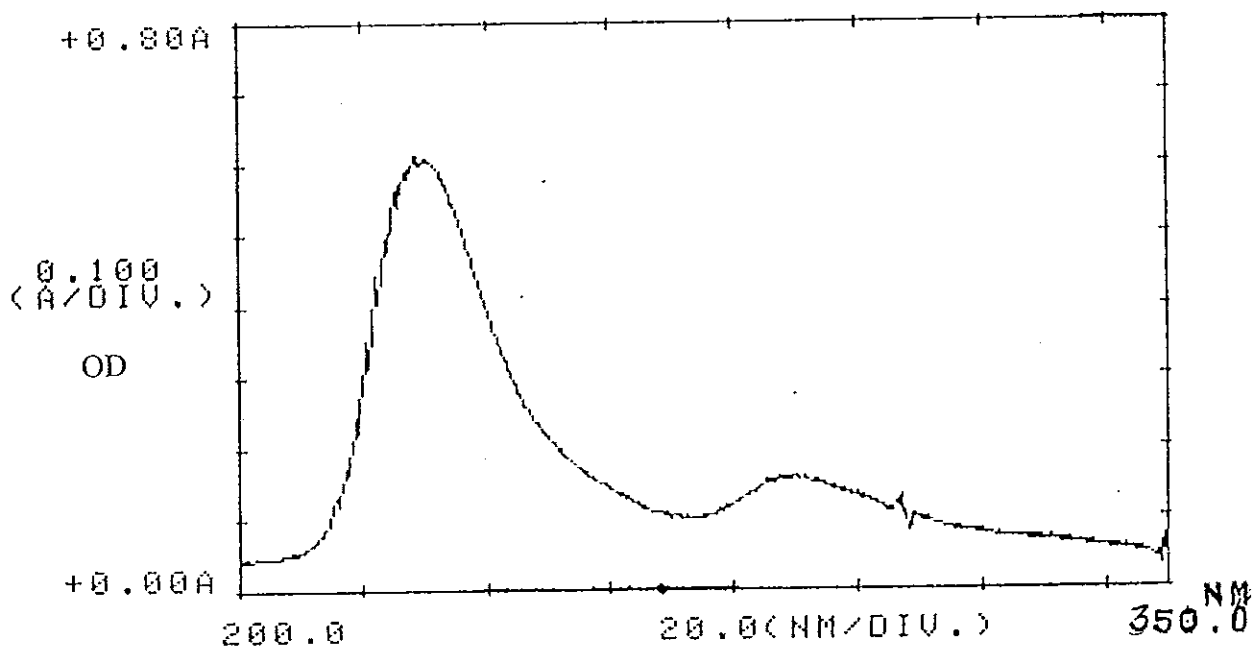
แถบที่ 1	อะไมโลกลูโคไซด์เลส	มีค่า pI 3.6
แถบที่ 2	ซอปปินทรูปซินอินฮิบิเตอร์	มีค่า pI 4.6
แถบที่ 3	เบต้า-แลคโทโกลบูลิน	มีค่า pI 5.1
แถบที่ 4	คาร์บอนิกแอนไฮเดรส	มีค่า pI 5.9
แถบที่ 5	คาร์บอนิกแอนไฮเดรส	มีค่า pI 6.6
แถบที่ 6	ไมโอโกลบิน	มีค่า pI 6.8
แถบที่ 7	ไมโอโกลบิน	มีค่า pI 7.2
แถบที่ 8	เลนทิลเลคติน	มีค่า pI 8.2
แถบที่ 9	เลนทิลเลคติน	มีค่า pI 8.6
แถบที่ 10	เลนทิลเลคติน	มีค่า pI 8.8
แถบที่ 11	ทริปซิโนเจน	มีค่า pI 9.3



รูปที่ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) กับค่า \log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน 6 ตัว คือ ฟอสโฟริเลสบี (MW. = 94,000 คาลตัน), โบวีนซีรัมอัลบูมิน (MW. = 67,000 คาลตัน), อัลบูมินจากไข่ (MW. = 43,000 คาลตัน), คาร์บอนิก แอนไฮเดรต (MW. = 30,000 คาลตัน), ทริพซินอินฮิบิเตอร์ (MW. = 20,000 คาลตัน) และ แอลฟา-แลคตัลบูมิน (MW. = 14,000 คาลตัน) จากกราฟหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ได้ 43,000 คาลตัน

3.5 สเปกตรัมของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่แยกได้จากน้ำยางพารา

เอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยผ่านขั้นตอนการสกัดเจลาจากอิเล็กโทรโฟเรซิสแบบสภาพธรรมชาติ ที่มีความว่องไวของเอนไซม์สูงสุด นำมาศึกษาการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น ตั้งแต่ 200 นาโนเมตร ถึง 350 นาโนเมตร เพื่อดูสเปกตรัมของเอนไซม์ HMG-CoA synthase พบว่าเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ขึ้น มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด เป็นพีคอยู่ 2 พีค พีคแรกที่มีความยาวคลื่น 229 นาโนเมตร ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงของพันธะเปปไทด์ และที่มีความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แสดงว่าเอนไซม์นี้มีกรดอะมิโนที่มีอะโรมาติกริง (aromatic ring) อยู่บ้างแต่ไม่มากนัก ดังรูปที่ 14



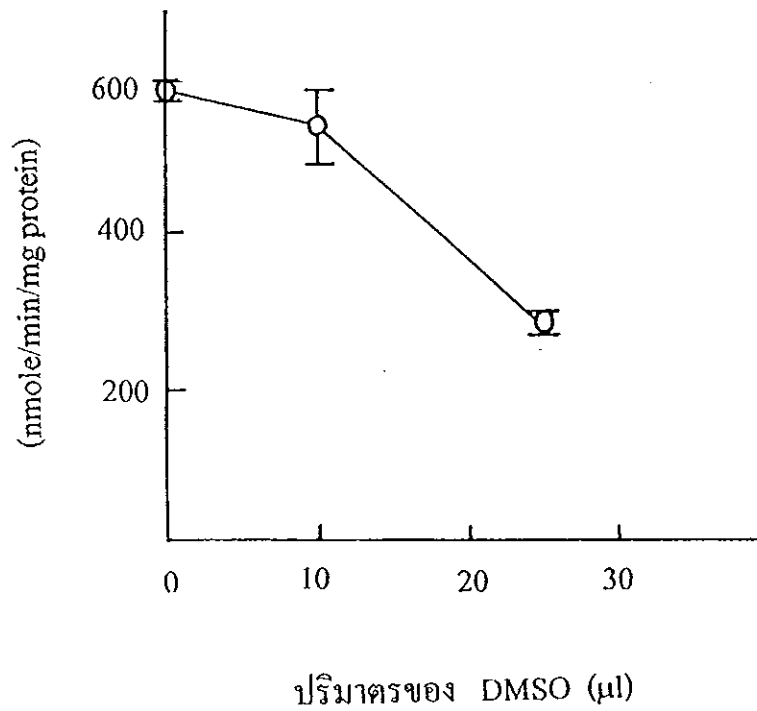
รูปที่ 14 สเปกตรัมของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ได้จากการสกัดเจลาจากเจลาอิเล็กโทรโฟเรซิสแบบสภาพธรรมชาติ บริเวณที่มีความว่องไวของเอนไซม์สูงสุด มีพีคอยู่ที่ความยาวคลื่น 229 นาโนเมตร ถึง 280 นาโนเมตร

3.6 ผลของสารยับยั้ง L-659, 699 ต่อการทำงานของเอนไซม์

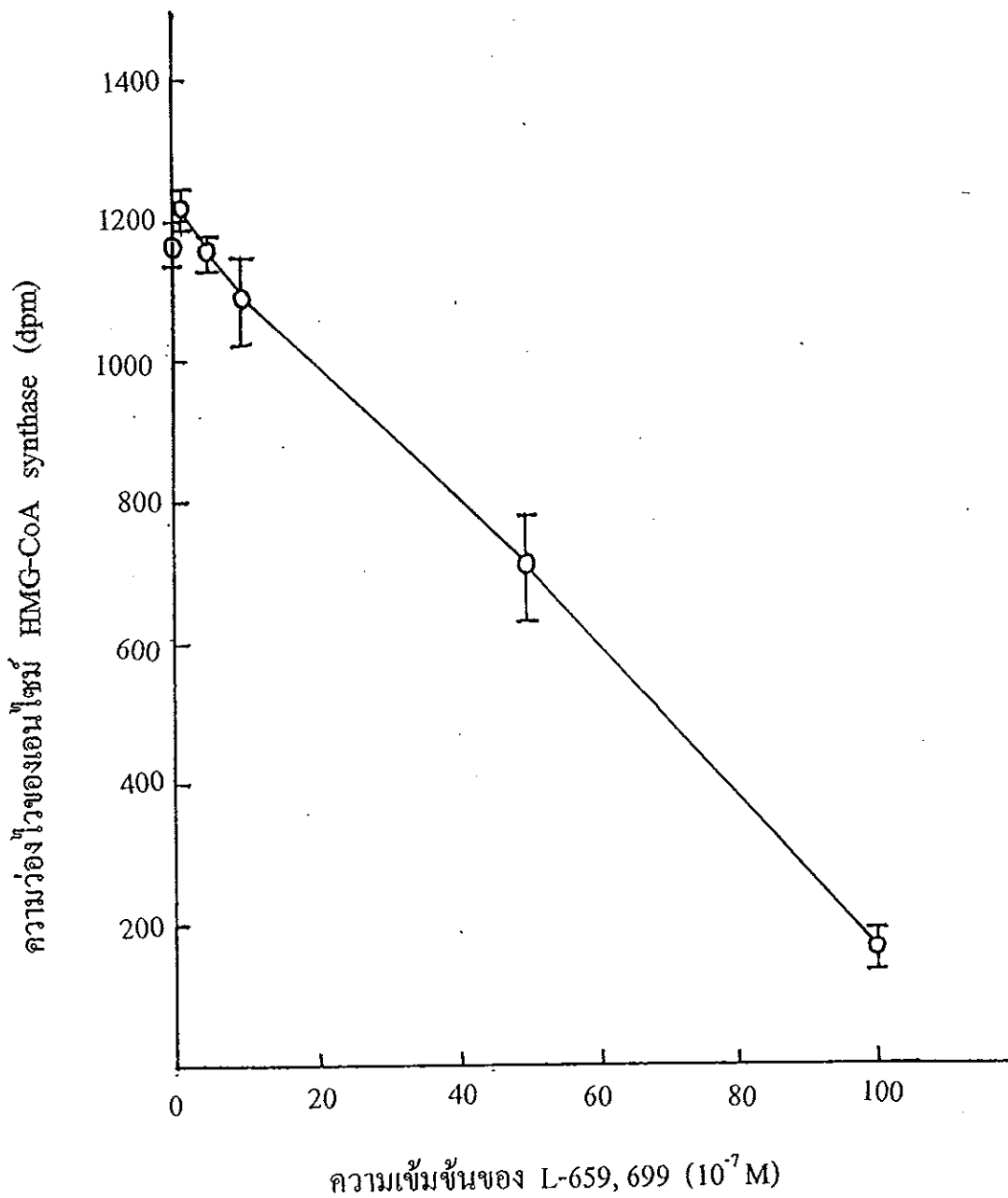
เป็นที่ทราบกันดีว่า L-659, 699 สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากแหล่งต่างๆ เช่น จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงได้ทำการทดลองว่าเอนไซม์นี้จากพืช โดยเฉพาะ จากซี-ซีรัม ของน้ำยางพาราจะถูกยับยั้งโดยสารยับยั้ง L-659, 699 ได้เช่นเดียวกับเอนไซม์ในสัตว์หรือไม่ พบว่าความว่องไวของเอนไซม์จาก ซี-ซีรัม ในน้ำยางพารา เริ่มถูกยับยั้งได้ด้วย L-659, 699 ที่ความเข้มข้นที่ 5×10^{-6} M ดังรูปที่ 15 ซึ่งจะเห็นได้ว่าความว่องไวของเอนไซม์ลดลงถึง 38% ที่ความเข้มข้น 5×10^{-6} M และลดลงถึง 86% ที่ความเข้มข้นของ L-659, 699 10^{-5} M เมื่อทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์ขึ้น โดยนำไปผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ต่างๆ (ในหัวข้อ 2.4 ถึง 2.4.3) โดยผ่านเจลฟิลเตรชัน แล้วพบว่าจะเริ่มถูกยับยั้ง โดย L-659, 699 ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 10^{-6} M แต่การยับยั้งจะเพิ่มสูงขึ้นเป็น 81% เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 5×10^{-6} M แสดงว่า เมื่อกำจัดโปรตีนอื่นๆออกไป เอนไซม์จะถูกยับยั้งได้ง่ายขึ้น และเมื่อเพิ่มเป็น 10^{-5} M การยับยั้งจะไม่เพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 16 และ 17

จากการทดลองนี้ใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย L-659, 699 จึงเป็นที่น่าสนใจว่า DMSO โดยลำพังจะมีผลต่อความว่องไวของเอนไซม์หรือไม่ จากการทดลองพบว่าเมื่อ DMSO เพิ่มปริมาณมากขึ้นความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ยิ่งลดลง ดังรูปที่ 15

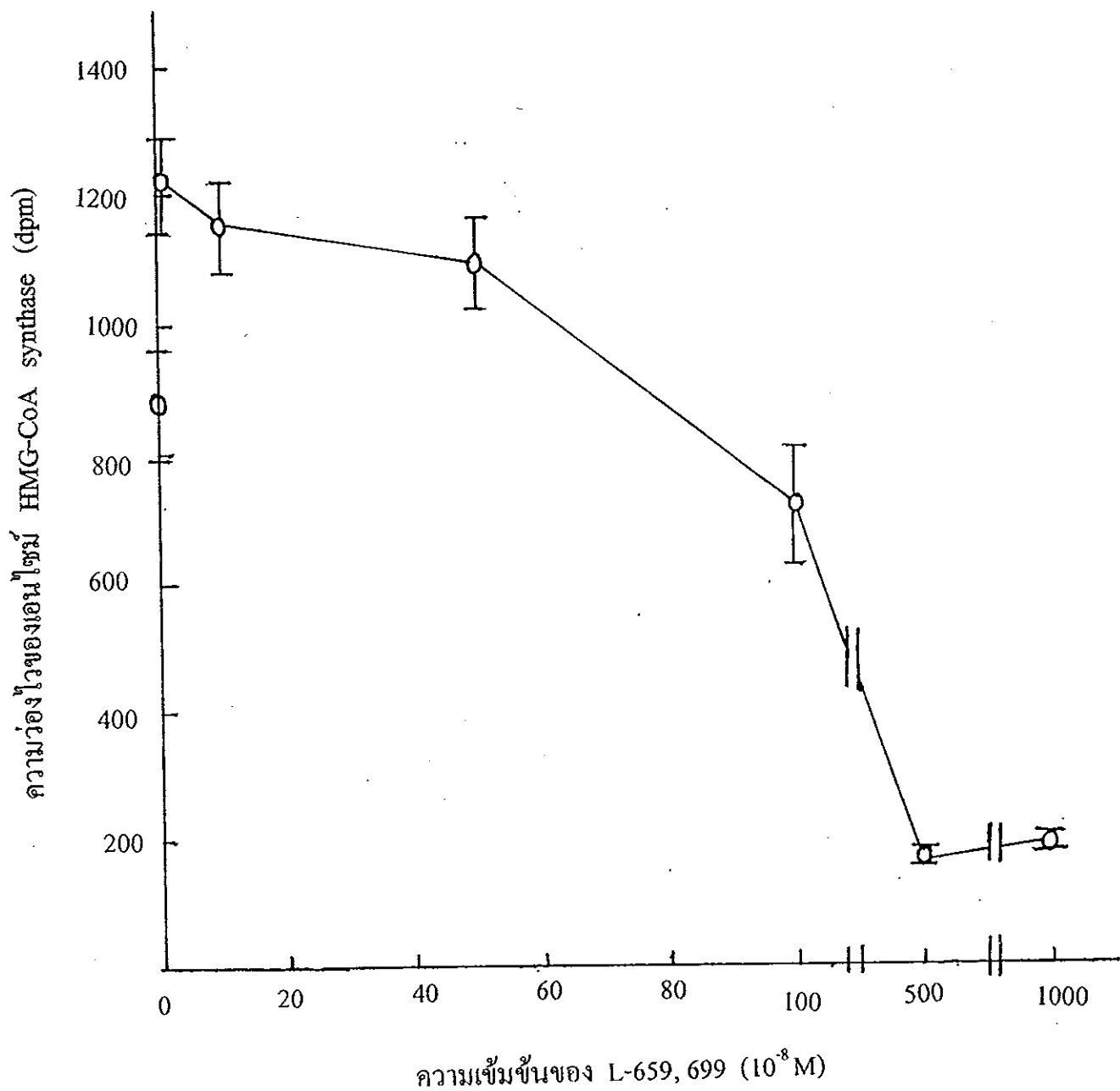
ความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ HMG-CoA synthase



รูปที่ 15 อิทธิพลของ DMSO ต่อการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ได้จากเซลล์เตตร้าเซลล์ ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 55 ไมโครกรัม ในปฏิกิริยาที่มีปริมาตร 100 ไมโครลิตร



รูปที่ 16 อิทธิพลของ L-659,699 ต่อความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในซี-ซีรัมจากน้ำยางพารา 10 ไมโครลิตร ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 38 ไมโครกรัม



รูปที่ 17 อิทธิพลของ L-659,699 ต่อความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ได้จากเจสพิสเตรชันที่ทำให้เข้มข้นขึ้น 10 ไมโครลิตร ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 55 ไมโครกรัม

3.7 ผลของ acetoacetyl CoA ต่อการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase

การศึกษาอิทธิพลของ acetoacetyl CoA ต่อการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ได้จากการสกัดเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแบบสภาพธรรมชาติพบว่าความว่องไวของเอนไซม์ เมื่อไม่มี acetoacetyl CoA เปรียบเทียบกับ เมื่อมี acetoacetyl CoA ดูเหมือนจะลดลง ดังตารางที่ 2 อย่างไรก็ตาม ความว่องไวของเอนไซม์ที่สกัดได้นี้ วัดได้เพียง 182 ± 34 dpm นับว่าค่ามาเกือบจะเท่ากับเมื่อไม่มีเอนไซม์จึงไม่อาจสรุปได้ว่าผลการทดลองนี้แตกต่างจากการศึกษาของสุริย์ (2539) ที่ศึกษาผลของ acetoacetyl CoA ความเข้มข้นต่างๆ ต่อความว่องไวของเอนไซม์ โดยใช้เอนไซม์ที่ผ่านการแยกโปรตีนอื่นๆออกเพียงบางส่วน จากขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โดยผ่าน CM-cellulose cation exchanger และ Sephadex G-75 ที่พบว่าความว่องไวของเอนไซม์ไม่แตกต่างกันไม่ว่าจะใช้ความเข้มข้นของ acetoacetyl CoA มากน้อย เพียงใด และในรายงานของ Suvachittanont และ Wititsuwannakul (1995)

ตารางที่ 2 ความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ค่อนข้างบริสุทธิ์จากการสกัดเจลเมื่อ มีและไม่มี acetoacetyl CoA

สารเคมี	ความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase (dpm \pm SE)
เอนไซม์ HMG-CoA synthase + 0.05mM acetoacetyl CoA	182 ± 34
เอนไซม์ HMG-CoA synthase + น้ำกลั่น	134 ± 6
เอนไซม์ HMG-CoA synthase + 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2	124 ± 7.5

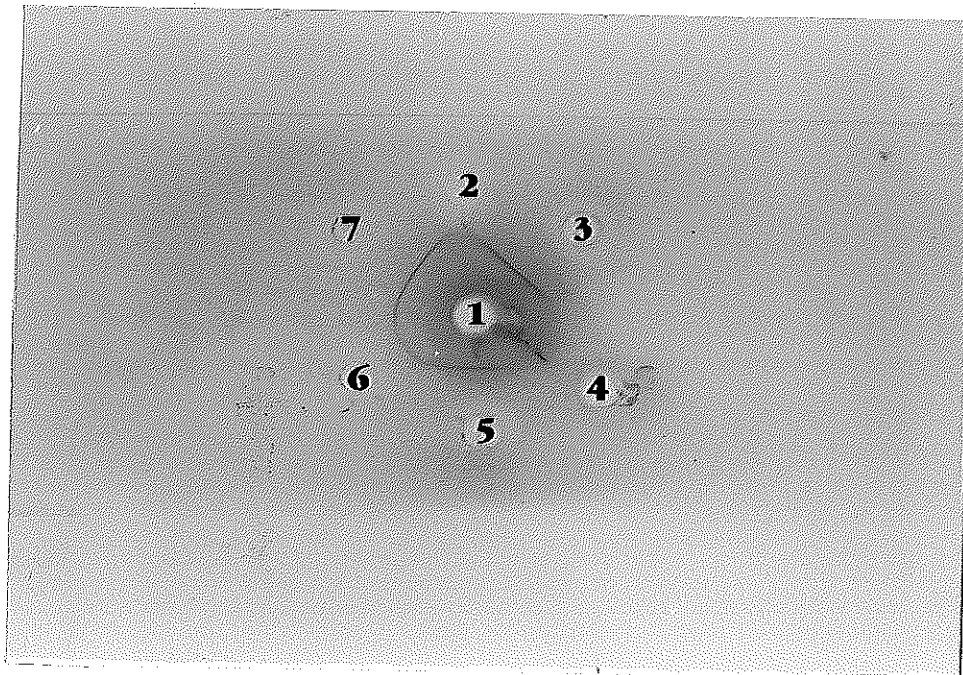
3.8 การกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี ต่อเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่แยกได้จาก น้ำยางพาราในสัตว์ทดลอง

การศึกษาการกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดี ต่อเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่แยกได้จากน้ำยางพารา ซึ่งผ่านการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น จากขั้นตอนการสกัดเกล็ดเล็กโทรโฟเรซิสแบบสภาพธรรมชาติโดยตรวจสอบว่ามีแอนติบอดีเกิดขึ้นหรือไม่ด้วย วิธี Ouchterlony double diffusion พบว่ามีแอนติบอดีเกิดขึ้นในซีรัมเลือด กระต่ายคังจะเห็นได้จากแถบเส้นตะกอนที่เกิดขึ้นระหว่างแอนติบอดีของกระต่ายกับเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในหลุมต่าง ๆ ดังรูปที่ 18 ในหลุมที่ 2, 3, 5, 6 และ 7 ซึ่งมีเอนไซม์อยู่ด้วย จะปรากฏแถบเส้นตะกอนระหว่างแอนติบอดีกับเอนไซม์ในตัวอย่าง ส่วนหลุมที่ 4 ซึ่งมีโปรตีน BSA จะไม่มีแถบเส้นตะกอน

แอนติบอดีในซีรัมของกระต่ายจะเริ่มเกิดขึ้น หลังจากการฉีดเอนไซม์หรือแอนติเจนประมาณ 2 เดือน และแอนติบอดีจะเริ่มน้อยลงภายหลังการหยุดฉีดเป็นเวลาประมาณ 2 เดือน สังเกตได้จากแถบเส้นตะกอนที่เกิดขึ้นในการทำ Ouchterlony double diffusion ที่มีแถบเส้นตะกอนสีจางลงและใช้เวลาในการเกิดแถบเส้นตะกอนช้าจึงทำการฉีดกระตุ้นกระต่ายซ้ำเป็นเวลา 1 เดือน (เดือนละ 2 ครั้ง) ก็สามารถกระตุ้นให้กระต่ายสามารถสร้างแอนติบอดีต่อเอนไซม์ HMG-CoA synthase ขึ้นมาใหม่ได้

3.9 ผลของแอนติบอดีต่อความว่องไวของเอนไซม์

ในการทดลองหาความว่องไวของเอนไซม์ที่มีอยู่ในซี-ซีรัม จากน้ำยางพาราและสารละลายผสมของซี-ซีรัมจากน้ำยางพารา (แอนติเจน) และแอนติบอดีต่อเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากกระต่าย พบว่าแอนติบอดีจากกระต่ายไม่สามารถยับยั้งความว่องไวของเอนไซม์จากซี-ซีรัม (แอนติเจนได้) ดังตารางที่ 3 แสดงว่าการจับของเอนไซม์และแอนติบอดี อาจไม่จับกันตรงบริเวณเร่งที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์



รูปที่ 18 แถบโปรตีนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาแบบจำเพาะระหว่างแอนติเจน
(เอนไซม์ HMG-CoA synthase) และแอนติบอดีของกระต่าย

- หลุมที่ 1 คือ แอนติบอดีของกระต่าย
- หลุมที่ 2 คือ ซี-ซีรัมที่ทำให้เข้มข้นขึ้น มีปริมาณ โปรตีน 54 ไมโครกรัม
- หลุมที่ 3 คือ เอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ได้จากการสกัดเจลมี ปริมาณโปรตีน 10 ไมโครกรัม
- หลุมที่ 4 คือ โปรตีน BSA
- หลุมที่ 5 คือ ซี-ซีรัมที่ทำให้เข้มข้นขึ้นและผ่าน CM-cellulose แล้วทำให้เข้มข้นขึ้นอีกครั้ง มีปริมาณโปรตีน 29 ไมโครกรัม
- หลุมที่ 6 คือ ซี-ซีรัมที่ทำให้เข้มข้นขึ้นและผ่าน CM-cellulose มี ปริมาณโปรตีน 33 ไมโครกรัม
- หลุมที่ 7 คือ ซี-ซีรัมที่ได้จากน้ำยางพารา มีปริมาณโปรตีน 38 ไมโครกรัม

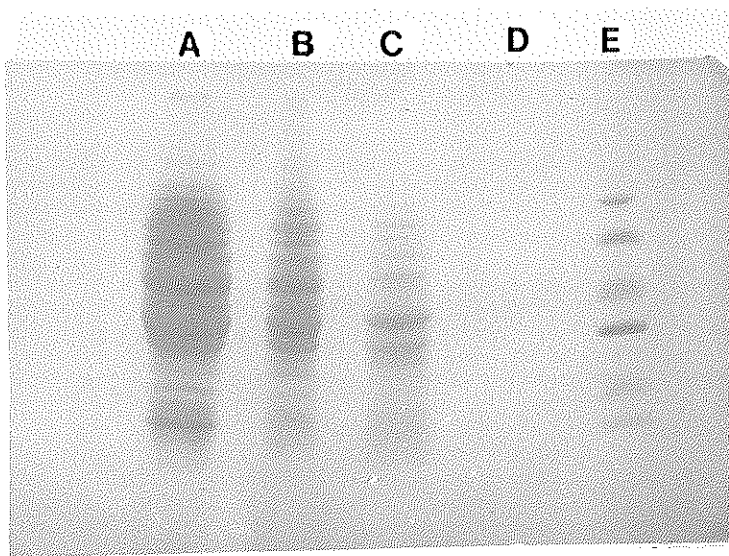
ตารางที่ 3 ความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในซี-ซีรัมจากน้ำยางพารา, แอนติบอดีจากกระต่าย และสารละลายผสมของซี-ซีรัมจากน้ำยางพาราและแอนติบอดีจากกระต่าย

สารเคมี	ความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase (dpm \pm SE)
ซี-ซีรัมจากน้ำยางพารา	974 \pm 32
แอนติบอดีจากกระต่าย	257 \pm 17
สารละลายผสมของซี-ซีรัมจากน้ำยางพาราและแอนติบอดีจากกระต่าย	1,003 \pm 10.4

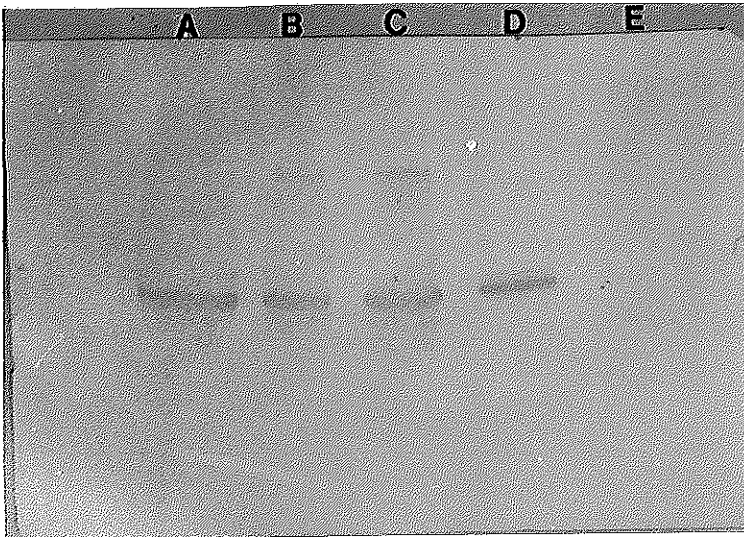
3.10 การตรวจสอบหาเอนไซม์ HMG-CoA synthase โดยวิธี Western blot

ในการทำ Western blot สามารถตรวจหาเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในน้ำยางพาราได้อย่างจำเพาะ รูปที่ 19 ก. แสดงแผ่น nitrocellulose ที่ได้จากการถ่ายโอนแถบโปรตีนในตัวอย่างต่างๆจาก SDS-PAGE และนำไปย้อมสี Ponceau S ดังรายละเอียดในหัวข้อ 2.15 ซึ่งจะเห็นว่ามีการย้อมสีโปรตีนสีส้มขนาดต่างๆอยู่มากมายในสารตัวอย่างที่นำมาทดสอบแยกตามขนาดของโปรตีนในสารตัวอย่าง และในรูป 19 ข. HMG-CoA synthase ในแผ่น nitrocellulose ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีจากซีรัมของกระต่าย จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีตัวที่ 2 ซึ่งเชื่อมต่อกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีของเลือดกระต่ายได้ หลังจากย้อมด้วยสารตั้งต้นของเปอร์ออกซิเดส จะปรากฏแถบสีส้มของเอนไซม์ที่ชัดเจนเพียงแถบเดียวแสดงให้เห็นได้ว่า Western blot สามารถตรวจหาเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในตัวอย่างที่มีเอนไซม์นี้ได้ จากรูป 19 ตัวอย่างที่ใช้จะมีปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกัน ในรูปที่ 19 ก. ช่อง A เป็นตัวอย่างของ ซี-ซีรัมที่มีโปรตีนมากมายหลายชนิดปนกัน ช่อง B เป็น

ก



ข



รูปที่ 19 แสดงการทำ Western blot เปรียบเทียบโปรตีนที่แยกได้บนแผ่น nitrocellulose ที่ย้อมด้วย Ponceau S (รูป ก) กับ ที่ย้อมด้วย แอนติบอดีต่อเอนไซม์ HMG-CoA synthase (รูป ข)

- A คือ ซี-ซีรัมที่ได้จากน้ำยางพารา
- B คือ ซี-ซีรัมที่ผ่าน CM-cellulose cation exchanger
- C คือ ซี-ซีรัมที่ผ่านเจลฟิลเทรชัน (Sephadex G-75)
- D คือ เอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ได้จากการสกัดเจล
- E คือ โปรตีนมาตรฐาน

ตัวอย่างของซี-ซีรัมที่มีการกำจัดโปรตีนบางส่วนออกไปแล้ว ชนิดของโปรตีนจึงน้อยลง และเมื่อนำไปผ่านเจลฟิลเตรชัน โปรตีนอื่นๆที่มีเอนไซม์ก็จะลดลงด้วยดังในช่อง C และเมื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยผ่าน native PAGE และสก็ดเจลในช่อง D พบว่ามีโปรตีนน้อยมากจนย้อมด้วย Ponceau S แทบไม่เห็น . แต่เมื่อย้อมด้วยซบสเตรทของเปอร์ออกซิเดส ดังรูปที่ 19 ข. จะพบว่า มีแถบสีส้มของเอนไซม์ที่ชัดเจนเพียงแถบเดียวในทุกช่อง โดยเฉพาะในช่อง D ซึ่งแม้จะมีโปรตีนน้อยจนไม่อาจย้อมติดสี Ponceau S รูป 19 ก. ก็สามารถย้อมหา HMG-CoA synthase โดยทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่ชัดเจนกว่าช่องใดๆ แสดงว่าสามารถนำแอนติบอดีที่เตรียมได้ไปใช้ในการตรวจหาเอนไซม์ในตัวอย่างได้

3.11 การตรวจหาเอนไซม์ HMG-CoA synthase โดยวิธี Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

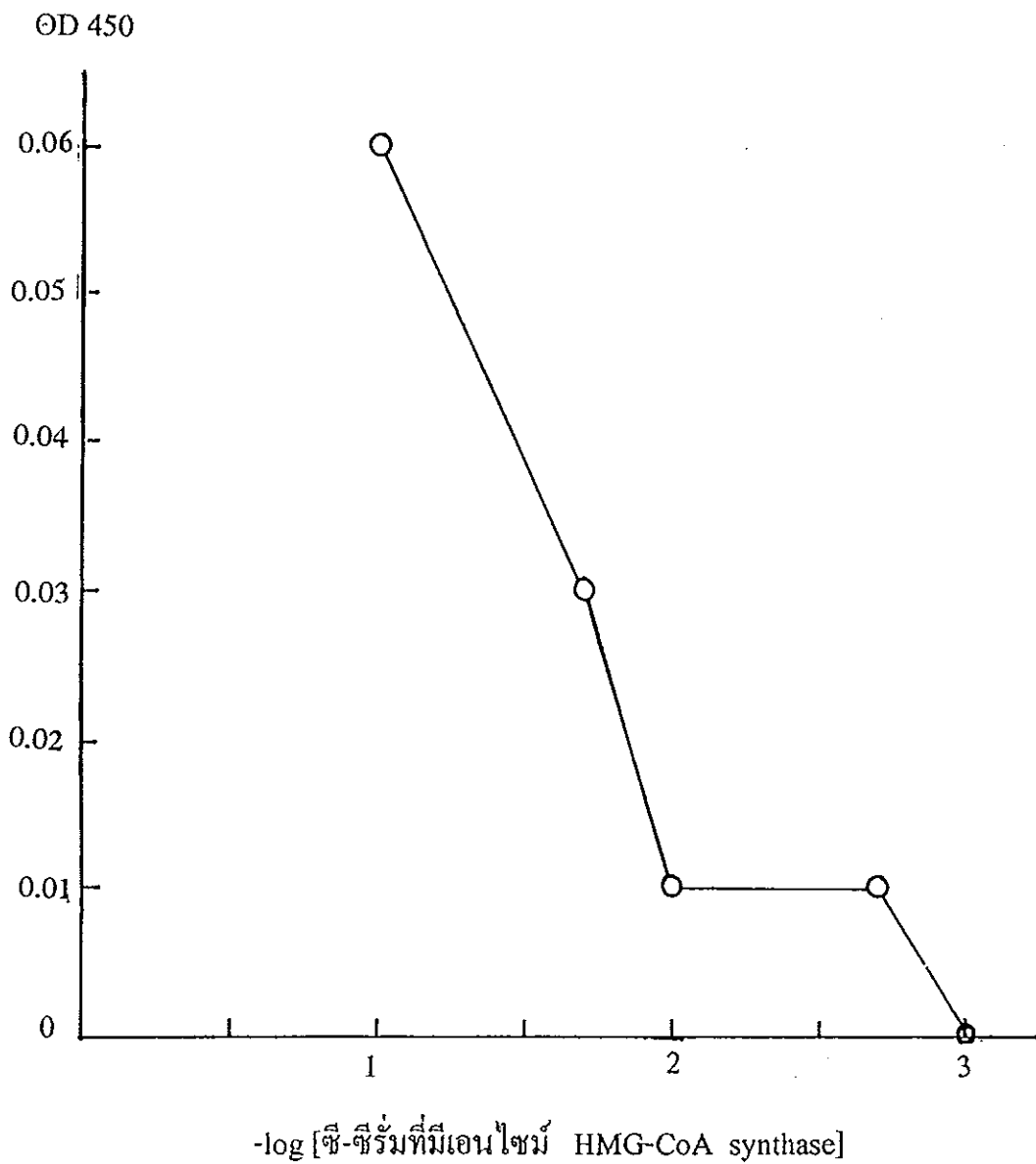
จากการนำ ซี-ซีรัม มาตรวจหาเอนไซม์ HMG-CoA synthase โดยวิธี ELISA ตามรายละเอียดในหัวข้อ 2.14 ในวิธีที่ 1 (การฉาบเพลทด้วยแอนติเจน) เมื่อใช้ซี-ซีรัมจากน้ำยางพารา ซึ่งมีเอนไซม์ HMG-CoA synthase อยู่ด้วยความเข้มข้นต่างกัน พบว่า ที่ความเข้มข้น 1 : 10 มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ได้สูงสุดโดยเริ่มมีแนวโน้มที่สูงขึ้น ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 1 : 50 และ 1 : 10 ตามลำดับ (ดังรูปที่ 21)

และเมื่อศึกษาการหาปริมาณเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ได้จากน้ำยางพารา ในส่วนซี-ซีรัม โดยวิธี ELISA วิธีที่ 2 (การฉาบเพลทด้วยแอนติบอดี) พบว่า ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ที่ได้จากซี-ซีรัมที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1 : 10, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 500 และ 1 : 1,000 ไม่มีความแตกต่างกัน (ดังรูปที่ 21)

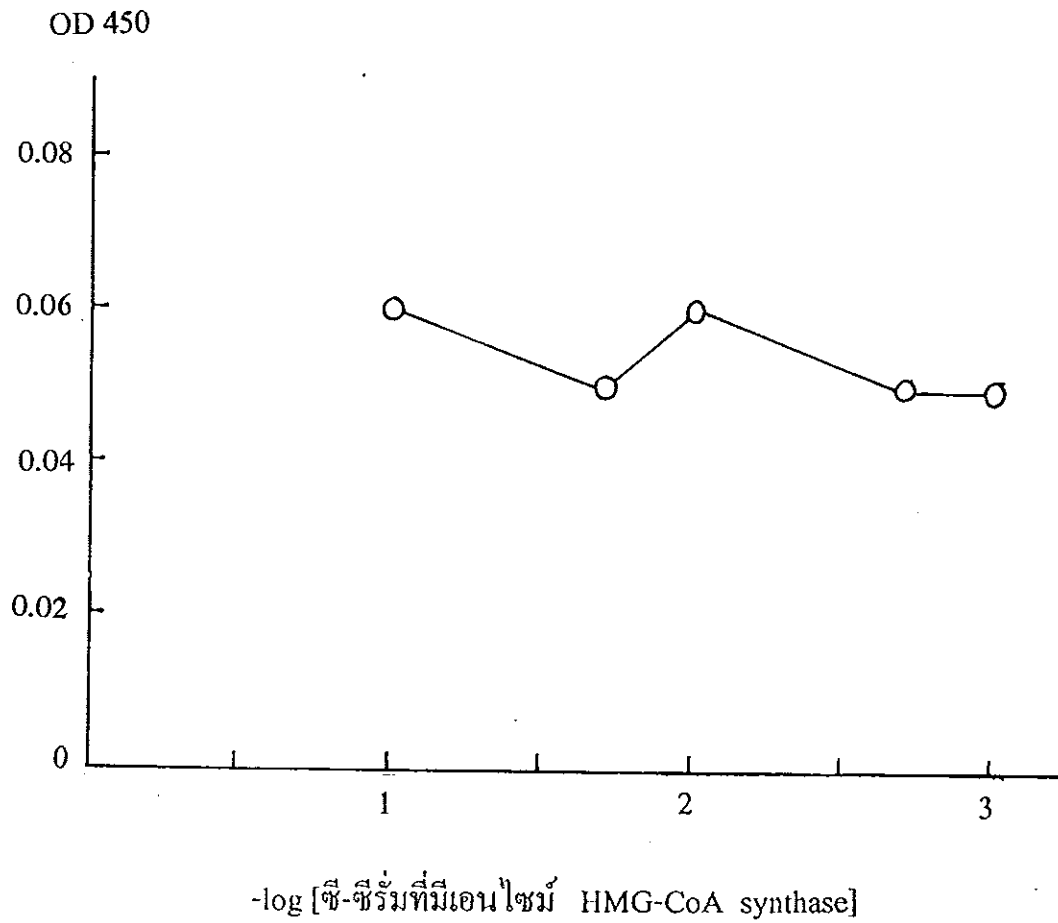
นอกจากนั้น การหาปริมาณเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ได้จากน้ำยางพารา ในส่วนซี-ซีรัม โดยวิธี ELISA วิธีที่ 3 (ฉาบเพลทด้วยสารละลายผสมระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี) พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก จึงดูเหมือนเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่มีอยู่ในซี-ซีรัม ที่ความเข้มข้นน้อยกลับดูดกลืน

แสงมาก (ดังรูปที่ 22) และซี-ซีรั่มที่ความเข้มข้น 1 : 500 ดูเหมือนมีการดูดกลืนแสง
ได้สูงสุด

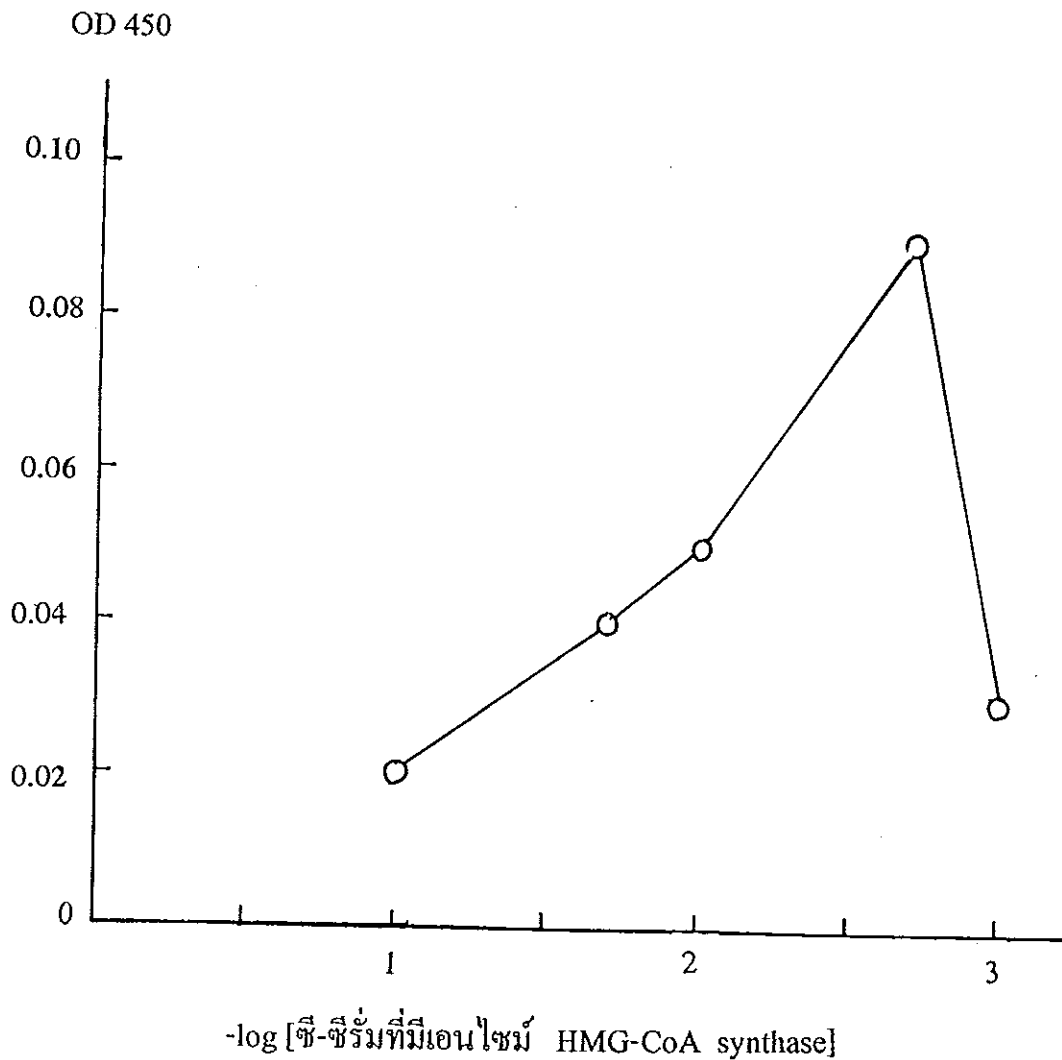
จากผลการทดลองทั้งสามรูปแบบในรูปที่ 20, 21 และ 22 แสดงว่าวิธีที่ 1 มีแนว
โน้มที่น่าจะใช้ในการหาปริมาณเอนไซม์ได้ เนื่องจากเมื่อปริมาณเอนไซม์ HMG-CoA
synthase ลดลง ค่าการดูดกลืนแสงก็ลดลงด้วยเช่นกัน แต่ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้มี
ค่าน้อย จึงจำเป็นต้องศึกษาสภาวะแวดล้อมต่างๆในการทำ ELISA เพื่อให้ค่าการดูด
กลืนแสงที่อ่านได้สูงขึ้น จึงจะสรุปให้ชัดเจนได้ ส่วนวิธีที่ 2 และวิธีที่ 3 (รูปที่ 21 และ
22) ยังไม่สามารถใช้แอนติบอดีจากซีรั่มของกระต่ายหาปริมาณเอนไซม์ HMG-CoA
synthase ที่มีอยู่ในซี-ซีรั่มให้ถูกต้องได้



รูปที่ 20 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Cholesterol HMG-CoA synthase กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ในการตรวจหาเอนไซม์ โดย ELISA วิธีที่ 1 (การจับเพลทด้วยแอนติเจน)



รูปที่ 21 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ ซี-ซีรัมที่มีเอนไซม์ HMG-CoA synthase กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ในการตรวจหาเอนไซม์ โดย ELISA วิธีที่ 2 (การฉาบเพลทด้วยแอนติบอดี)



รูปที่ 22 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซี-ซีรัมที่มีเอ็นไซม์ HMG-CoA synthase กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ในการตรวจหาเอ็นไซม์ โดย ELISA วิธีที่ 3 (ฉาบเพลทด้วยสารละลายผสมระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี)

4. วิจารณ์

4.1 การทำให้เอนไซม์ HMG-CoA synthase บริสุทธิ์ขึ้น

เอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้ CM-cellulose cation exchanger และ เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี (Sephadex G-75) ผลการทำให้บริสุทธิ์ได้ความบริสุทธิ์ใกล้เคียงกัน และในการศึกษานี้จะไม่ใช้ DEAE-cellulose ในการแยกเอนไซม์เพราะต้องหลีกเลี่ยงการใช้เกลือในการชะตัวอย่างออกมา เพราะเกลือจะทำให้เอนไซม์ลดความว่องไว

ในการทดลองนี้ ต้องการเตรียมเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่บริสุทธิ์ให้ได้มีปริมาณเพียงพอที่จะใช้ฉีดกระตุ้นกระต่ายและหนู เพื่อให้สร้างแอนติบอดีซึ่งต้องใช้เอนไซม์บริสุทธิ์ปริมาณมาก และกระตุ้นใช้เวลานาน จึงจะทำให้กระต่ายสามารถสร้างแอนติบอดีต่อเอนไซม์ HMG-CoA synthase ได้มากเพียงพอ จึงจำเป็นต้องทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์หลายครั้ง แต่แต่ละครั้งจะต้องทำให้รวดเร็ว เอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ได้จากการสกัดเจลาภายหลังการแยกโปรตีนอื่นๆออกโดยวิธี native PAGE นั้น จำเป็นต้องมีความว่องไวของเอนไซม์อยู่เพื่อทำให้ทราบว่าเป็นเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ต้องการจริงๆ แม้ว่าการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง ไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่มีความว่องไวจำเพาะสูงๆ แม้ว่าจะเสียสภาพทางธรรมชาติแล้วก็สามารถใช้กระตุ้นสัตว์ทดลองได้ แต่จะต้องแน่ใจว่าเป็นเอนไซม์ HMG-CoA synthase จริงๆ ซึ่งจากการศึกษาเอนไซม์ที่แยกได้ โดยใช้ native PAGE เอนไซม์ที่แยกได้นี้ยังคงมีความว่องไวของเอนไซม์อยู่ และค่อนข้างบริสุทธิ์ สังเกตได้จากการมีแถบโปรตีนนี้ชัดเจนเพียงแถบเดียว ใน SDS-PAGE

4.2 สมบัติของเอนไซม์ HMG-CoA synthase

จากการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ HMG-CoA synthase โดยวิธี SDS-PAGE มีน้ำหนัก 43,000 ดาลตัน นับว่ามีค่าใกล้เคียงกับในรายงานของสุริย์ (2539) ที่

พบว่ามือน้ำหนักโมเลกุล 44,670 ดาลตัน แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย แต่มือน้ำหนักโมเลกุลของ HMG-CoA synthase จากซี-ซีรัมของยางพาราที่ได้แตกต่างจาก เอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไซโตพลาสซึมจากตับไก่ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 90,000-100,000 ดาลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 52,000-58,000 ดาลตัน (Clinkenbeard และคณะ 1975b) และแตกต่างจากเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียจากตับไก่ มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 96,000-105,000 ดาลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 52,000 ดาลตัน ในพีช Bach และคณะ (1990-1991) พบว่า เอนไซม์ AACT/HMGS จากต้นอ่อนของผักกาดหนู มีน้ำหนักโมเลกุล 54,000 ดาลตัน ส่วน Weber และคณะ (1994) พบว่า เอนไซม์ AACT/HMGS จากต้นอ่อนผักกาดหนู มีน้ำหนักโมเลกุล $55,500 \pm 2,000$ ดาลตัน โดยวิธี SDS-PAGE นอกจากนี้ยังพบว่า เอนไซม์ HMG-CoA synthase เป็นเอนไซม์ที่มี 1 หน่วยย่อย ซึ่งต่างจากเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในสัตว์ ซึ่งสอดคล้องกับ HMG-CoA synthase จากซี-ซีรัมของยางพารา จากการศึกษาี้ และการศึกษาของสุริย์ (2539)

นอกจากนั้น ค่า pI ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในสัตว์มีการศึกษากันมาก แต่ในพืชชนิดอื่น ๆ ยังไม่มีการศึกษาค่าดังกล่าว Clinkenbeard และคณะ (1975 a, b) พบว่าเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไซโตพลาสซึมของตับไก่ มีค่า pI 2 ค่า คือ pI 4.8 และ 6.7 ส่วนค่า pI ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียของตับไก่มีค่า pI 7.2 ค่า pI ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในซี-ซีรัมจากน้ำยางพารามีค่า 4.6 ใกล้เคียงกับค่า pI ของเอนไซม์ที่พบในไซโตพลาสซึมของตับไก่ (pI 4.8) ทั้งนี้เนื่องจาก ซี-ซีรัมจากน้ำยางพารา เปรียบเสมือนของเหลวในไซโตพลาสซึม (cytosolic fluid) ดังนั้น ค่า pI จากซี-ซีรัมจึงมีค่าใกล้เคียงกับค่า pI จากไซโตพลาสซึม มากกว่าในไมโทคอนเดรีย

4.3 สเปกตรัมของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่แยกได้จากยางพารา

สเปกตรัมของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ได้จากการสกัดเจล ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรได้น้อย แสดงว่ามีกรดอะมิโนในกลุ่มอะโรมาติกริง เช่น

(เฟนิลอะลานีน, ทริปโตเฟน, โทโรซีน) เพียงเล็กน้อย จากการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของ HMG-CoA synthase ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์กรดอะมิโน จากการศึกษาลำดับการเรียงตัวของเบสบน cDNA ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากยางพารา พบว่า ในกรดอะมิโนทั้งหมด 464 ตัว จะเป็น เฟนิลอะลานีน 26 ตัว และทริปโตเฟน อยู่ 2 ตัว (ข้อมูลจากเปลือก สุวรรณมณี) ดังนั้นหากสามารถแยก HMG-CoA synthase ที่บริสุทธิ์จากซี-ซีรัมได้มากพอที่จะนำไปเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์โดยใช้ลำดับการเรียงตัวของเบสบน cDNA ของ HMG-CoA synthase ที่แยกได้โดยเปลือก สุวรรณมณี กับเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่แยกได้จากการศึกษานี้

4.4 ผลของ L-659, 699 ต่อความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase

จากการทดลองใช้ L-659, 699 ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่แยกได้จากเจลฟิลเตรชัน และเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในซี-ซีรัม พบว่า L-659, 699 สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่แยกได้จากเจลฟิลเตรชัน ที่ความเข้มข้น 5×10^{-6} M ซึ่งต่ำกว่าความเข้มข้นที่ใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในซี-ซีรัม 10^{-5} M ทั้งนี้อาจเนื่องจากเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ได้จากเจลฟิลเตรชัน ผ่านการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีทางชีวเคมี เช่น การใช้ CM-cellulose ชนิดผงในการดึงน้ำออกจากซี-ซีรัม, ใช้ CM-cellulose cation exchanger, การผ่านเจลฟิลเตรชันชนิด Sephadex G-75 HMG-CoA synthase ในซี-ซีรัมถูกยับยั้งโดย L-659, 699 ที่ความเข้มข้น 10^{-5} M ได้ถึง 86% ในขณะที่ เอนไซม์ที่ได้จากเจลฟิลเตรชันมีเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่บริสุทธิ์สูงกว่าในซี-ซีรัม ถูกยับยั้ง โดย L-659, 699 ความเข้มข้น 10^{-6} M ถึง 81% เป็นไปได้ว่า เมื่อกำจัดโปรตีนบางส่วนออกไปซึ่งอาจทำให้โปรตีนตัวอื่นๆ ที่คอยป้องกัน HMG-CoA synthase ถูกกำจัดออกไป ความเข้มข้นของ L-659, 699 ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในซี-ซีรัม สูงกว่าที่ Greenspan และคณะ (1987) รายงานไว้เล็กน้อย โดย HMG-CoA synthase จากไซโตพลาสซึมของคัพหนู ถูกยับยั้งโดย L-659, 699 ได้ถึง 50% ที่ 1.2×10^{-7} M

(เฟนิลอะลานีน, ทริปโตเฟน, โทโรซีน) เพียงเล็กน้อย จากการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของ HMG-CoA synthase ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์กรดอะมิโน จากการศึกษาลำดับการเรียงตัวของเบสบน cDNA ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากยางพารา พบว่า ในกรดอะมิโนทั้งหมด 464 ตัว จะเป็น เฟนิลอะลานีน 26 ตัว และทริปโตเฟน อยู่ 2 ตัว (ข้อมูลจากเปลื้อง สุวรรณมณี) ดังนั้นหากสามารถแยก HMG-CoA synthase ที่บริสุทธิ์จากซี-ซีรัมได้มากพอที่จะนำไปเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์โดยใช้ลำดับการเรียงตัวของเบสบน cDNA ของ HMG-CoA synthase ที่แยกได้โดยเปลื้อง สุวรรณมณี กับเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่แยกได้จากการศึกษานี้

4.4 ผลของ L-659, 699 ต่อความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase

จากการทดลองใช้ L-659, 699 ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่แยกได้จากเจลฟิลเตรชัน และเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในซี-ซีรัม พบว่า L-659, 699 สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่แยกได้จากเจลฟิลเตรชัน ที่ความเข้มข้น 5×10^{-6} M ซึ่งต่ำกว่าความเข้มข้นที่ใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในซี-ซีรัม 10^{-5} M ทั้งนี้อาจเนื่องจากเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ได้จากเจลฟิลเตรชัน ผ่านการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีทางชีวเคมี เช่น การใช้ CM-cellulose ชนิดผงในการดึงน้ำออกจากซี-ซีรัม, ใช้ CM-cellulose cation exchanger, การผ่านเจลฟิลเตรชันชนิด Sephadex G-75 HMG-CoA synthase ในซี-ซีรัมถูกยับยั้งโดย L-659, 699 ที่ความเข้มข้น 10^{-5} M ได้ถึง 86% ในขณะที่ เอนไซม์ที่ได้จากเจลฟิลเตรชันมีเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่บริสุทธิ์สูงกว่าในซี-ซีรัม ถูกยับยั้ง โดย L-659, 699 ความเข้มข้น 10^{-6} M ถึง 81% เป็นไปได้ว่า เมื่อกำจัดโปรตีนบางส่วนออกไปซึ่งอาจทำให้โปรตีนตัวอื่นๆ ที่คอยป้องกัน HMG-CoA synthase ถูกกำจัดออกไป ความเข้มข้นของ L-659, 699 ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในซี-ซีรัม สูงกว่าที่ Greenspan และคณะ (1987) รายงานไว้เล็กน้อย โดย HMG-CoA synthase จากไซโตพลาสซึมของคัพหนู ถูกยับยั้งโดย L-659, 699 ได้ถึง 50% ที่ 1.2×10^{-7} M

L-659, 699 เป็นตัวยับยั้งแบบจำเพาะต่อเอนไซม์ HMG-CoA synthase โดยไม่มีผลต่อเอนไซม์ตัวอื่นที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล และคีโตนบอดี เช่น HMG-CoA reductase, β - ketoacetyl- CoA thiolase, acetoacetyl CoA synthetase และ fatty acid synthase นอกจากการยับยั้ง L-659, 699 ต่อเอนไซม์ ในต้นหนูพบว่าอาจมีลักษณะเป็นการยับยั้งย้อนกลับได้และแบบแข่งขันกันกับ acetyl CoA และ acetoacetyl Co A ซึ่งเป็นซับสเตรทของเอนไซม์ HMG-CoA synthase (Greenspan *et al.*, 1987) สำหรับลักษณะการยับยั้งของ L-659, 699 ต่อเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากน้ียงพารา ยังไม่ได้ศึกษาในรายละเอียดว่าจะมีลักษณะการยับยั้งแบบแข่งขันหรือไม่ เนื่องจากต้องการศึกษาผลของตัวยับยั้งกับเอนไซม์ที่แยกได้ก่อนข้างบริสุทธิ แต่จากการทดลอง มักพบว่าเอนไซม์ที่ค่อนข้างบริสุทธิมักสูญเสียความว่องไวไปจนเกือบหมด

ในการศึกษาผลของ L-659, 699 ต่อการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในซี-ซีรัมได้ทำการศึกษาโดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย L-659, 699 และพบว่า DMSO จาก 0, 10 และ 25 ไมโครลิตร ตามลำดับ ความว่องไวของเอนไซม์ ลดลงจาก 588 ± 7 เป็น 278 ± 8 dpm แสดงว่า DMSO อาจมีผลต่อการละลายของเอนไซม์ ซึ่งทำให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาลดลงด้วย

4.5 ผลของ acetoacetyl CoA ต่อการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase

ในการศึกษาผลของ acetoacetyl CoA ต่อการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase มีรายงานว่า ความว่องไวของเอนไซม์ในซี-ซีรัม ใกล้เคียงกับในหลอดที่มีและไม่มี acetoacetyl CoA แสดงว่า acetoacetyl CoA ไม่น่าจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ อาจกล่าวได้ว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้แม้ว่าไม่มีการเติม acetoacetyl CoA ลงไปในปฏิกิริยา (Suvachittanont and Wititsuwannakul, 1995) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะมี acetoacetyl CoA ในซี-ซีรัม อยู่เพียงพอสำหรับปฏิกิริยา นอกจากนี้ (Shah, 1982) ยังพบว่า acetoacetyl CoA ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในไซโตพลาสซึมของสมองหนู เนื่องจากมี acetoacetyl CoA อยู่ในไซโตพลาสซึมในสมองหนูเพียงพอ ใน

รายงานของสุริย์ (2539) พบว่า acetoacetyl CoA ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน 0-0.25 mM ไม่มีผลต่อความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ได้จากเจดฟิลเตรชัน ส่วน Bach และคณะ (1989) พบว่า acetoacetyl CoA ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่แยกได้จากต้นอ่อนของผักกาดหนูเช่นกัน แต่ต่อมา Bach และคณะ (1991) คิดว่าเป็นเช่นนี้เนื่องจากเอนไซม์ HMG-CoA synthase และ acetoacetyl CoA thiolase ในต้นอ่อนของผักกาดหนู อาจเป็นเอนไซม์ตัวเดียวกัน แต่มีหน้าที่การทำงานสองอย่าง คือ HMG-CoA synthase และ acetoacetyl CoA thiolase

จากการทดลองนี้ ศึกษาผลของ acetoacetyl CoA มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ ซึ่งได้จากการสกัดเจดอิเล็กโทรโพเรซิสแบบสภาพธรรมชาติ พบว่า เอนไซม์ HMG-CoA synthase เมื่อมี acetoacetyl CoA (182 ± 34 dpm) และเมื่อไม่มี acetoacetyl CoA จะมีความว่องไว 124 ± 7.5 dpm ซึ่งต่ำกว่าเมื่อมี acetoacetyl CoA ดังนั้น acetoacetyl CoA จึงน่าจะมีผลทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ดีขึ้น เนื่องจากเอนไซม์ที่ได้ค่อนข้างบริสุทธิ์ โปรตีนที่มีโมเลกุลเล็กๆและ acetoacetyl CoA (endogenous substrate) ที่มีอยู่ ถูกกำจัดออกไป จึงทำให้ acetoacetyl CoA ที่เติมลงไปไม่มีผลต่อความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase อย่งไรก็ตามความว่องไวของเอนไซม์บริสุทธิ์นี้ค่อนข้างต่ำมาก หากจะให้แน่ใจว่า acetoacetyl CoA มีผลต่อปฏิกิริยา จำเป็นต้องมีเอนไซม์ที่มีความว่องไวสูงและมีปริมาณเอนไซม์เพียงพอที่จะทำการศึกษาลงหลายๆครั้งได้

เอนไซม์ HMG-CoA synthase ในยางพาราจะสามารถเร่งปฏิกิริยา acetoacetyl CoA thiolase ได้หรือไม่นั้น ในการศึกษาเรื่องนี้ยังไม่อาจบอกได้ว่า HMG-CoA synthase ในยางพาราจะมี acetoacetyl CoA thiolase หรือไม่ เพราะเรายังไม่สามารถแยกเอนไซม์นี้ให้บริสุทธิ์และมีความว่องไวสูง หากนำเอนไซม์ที่ไม่บริสุทธิ์ไปศึกษา acetoacetyl CoA thiolase การพบความว่องไวของเอนไซม์ thiolase อาจเนื่องมาจากโปรตีนอื่นๆที่ปนเปื้อนก็ได้

4.6 แอนติบอดีต่อ HMG-CoA synthase จากสัตว์ทดลอง

ภายหลังการใช้เอนไซม์กระตุ้นให้หนูและกระต่ายสร้างแอนติบอดีต่อ HMG-CoA synthase แล้ว ตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีของกระต่ายและหนู โดยวิธี Ouchterlony double diffusion แล้วสามารถกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีได้ทั้งในกระต่ายและหนู แต่เพื่อให้ได้แอนติบอดีมากพอในการนำไปใช้ จึงได้เลือกเอาแอนติซีรัมกระต่ายมาใช้ในการศึกษา ในการตรวจสอบหาแอนติบอดี พบว่า เกิดแถบเส้นตะกอนโปรตีนระหว่างหลุมของแอนติบอดีกับหลุมอื่น ๆ ที่มีเอนไซม์ HMG-CoA synthase อยู่ด้วย แสดงให้เห็นว่าเกิดปฏิกิริยาจำเพาะระหว่าง แอนติเจน (เอนไซม์ HMG-CoA synthase) กับแอนติบอดี (ซีรัมที่ได้จากกระต่าย) ลักษณะเส้นตะกอนที่เกิดขึ้นระหว่างหลุมดังกล่าว มีลักษณะเป็นเส้นโค้งมน หากแอนติเจนในหลุมที่อยู่ติดกันเป็นแอนติเจนชนิดเดียวกัน (Reaction of identity) เส้นตะกอนที่เกิดขึ้นระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนในหลุมทั้งสองจะโค้งมาพบกันและต่อกันเรียบสนิทประหนึ่งเป็นเส้นโค้งเดียวกัน ถ้าแอนติเจนในหลุมที่อยู่ติดกันเป็นแอนติเจนต่างชนิดกัน เส้นตะกอนที่เกิดขึ้นระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนในแต่ละหลุมจะไม่มีความสัมพันธ์กัน เห็นเป็นเส้นตะกอนสองเส้นตัดกัน (Reaction of non-identity) และถ้าแอนติเจนในหลุมที่อยู่ติดกันมีบางส่วนที่เหมือนกัน เส้นตะกอนจะมีส่วนโค้งเข้าหากัน ซึ่งแสดงถึงส่วนที่เหมือนกันของแอนติเจนทั้งสองและมีส่วนหนึ่งยื่นยาวออกไปจากรอยโค้ง (Reaction of partial identity) (อรวดี และคณะ, 2536)

และเมื่อนำแอนติบอดีต่อเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากซีรัมกระต่ายมาผสมรวมกันกับเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในซี-ซีรัมของน้ำยางพารา พบว่าแอนติบอดีจากซีรัมกระต่ายไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ได้ และดูเหมือนแอนติบอดีจากซีรัมกระต่ายกระตุ้นการทำงานของ HMG-CoA synthase อาจเนื่องจากในซี-ซีรัมมีโปรตีนอื่นๆปะปนอยู่มากมาย โปรตีนเหล่านั้นอาจบดบังมิให้แอนติบอดีเข้าไปยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA synthase ได้ จึงทำให้ค่าที่อ่านได้สูงขึ้น

การศึกษาโดยวิธี Immunoblotting หรือ Western blot พบว่าสามารถตรวจหาเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในตัวอย่างต่างๆที่อาจมีเอนไซม์ เช่น ตัวอย่างที่ได้จากการทำให้เอนไซม์จากซี-ซีรัมบริสุทธิ์ขึ้นในขั้นตอนต่างๆ โดยแอนติบอดีจากกระต่าย

สามารถจับแบบจำเพาะต่อเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง และตรวจสอบการจับกับแอนติบอดีโดยแอนติบอดีตัวที่สอง ซึ่งเชื่อมต่อกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เมื่อเติมซับสเตรทของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสลงไปจะเกิดสีขึ้นมากน้อยต่างกัน ตามปริมาณเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่เตรียมได้ แสดงว่าเราสามารถนำ แอนติบอดีนี้มาใช้ในการตรวจสอบหาเอนไซม์ได้ และหากสามารถวัดความเข้มของแถบสีได้ ก็จะสามารถหาปริมาณของสารได้ด้วย การหาปริมาณเอนไซม์ในที่นี้เป็นปริมาณของเอนไซม์ HMG-CoA synthase แต่ไม่จำเป็นต้องเป็นเอนไซม์ที่มีความว่องไวของเอนไซม์อยู่ด้วยก็ได้ จากการวิเคราะห์แถบของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการศึกษานี้ รูป 20 ข ดูเหมือนมีแถบสีในช่อง B-C มากกว่า 1 แถบ โดยในช่อง B มีแถบโปรตีนน้อยกว่า C ซึ่งเป็น ซี-ซีรัมที่ผ่านเจลฟิลเตรชัน อาจเป็นไปได้ว่าเมื่อทำให้เอนไซม์ บริสุทธิ์มากขึ้น เอนไซม์ HMG-CoA synthase อาจจับกับสารอื่นในช่วงน้ำหนักโมเลกุลสูงๆ จึงทำให้ดูเหมือน มีแถบมากกว่า 1 แถบแต่เป็นแถบจางๆ เมื่อสกัดเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส พบว่ามีแถบเส้นตะกอนที่มีการจับกันแบบจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเกิดขึ้นชัดเจนเพียงแถบเดียว

เอนไซม์ HMG-CoA synthase ในสัตว์มีการศึกษากันมากถึงระดับยีน Royo และคณะ (1995) ศึกษาในไมโตคอนเดรียในตับหนู เพื่อศึกษาความจำเพาะระหว่าง polyclonal antibody ต่อ HMG-CoA synthase โดยอาศัยการเรียงตัวของเบสบน cDNA และศึกษาการเรียงตัวของกรดอะมิโนของ เอนไซม์ HMG-CoA synthase จากนั้นใช้เปปไทด์สังเคราะห์ขึ้นจากข้อมูล cDNA ทางด้านปลายอะมิโน และปลายคาร์บอกซี กระตุ้นการสร้างแอนติบอดี ในการศึกษาเรื่องของแอนติบอดีต่อ HMG-CoA synthase จากซี-ซีรัมของยางพารา เราอาจทำการศึกษาต่อโดยนำเอาเปปไทด์ส่วนของ C และ N terminal ของการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่ได้จาก cDNA ไปฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองให้สร้างแอนติบอดีและนำแอนติบอดีมาตรวจสอบว่าสามารถทำปฏิกิริยากับ HMG-CoA synthase จากยางพาราได้หรือไม่

นอกจากนี้ยังได้พยายามนำแอนติบอดีที่เตรียมได้มาใช้ในการหาปริมาณเอนไซม์โดยวิธี ELISA พบว่าการตรวจหาปริมาณเอนไซม์ยังไม่ให้ผลที่ชัดเจน เนื่องจากค่าที่การดูดกลืนแสง อ่านได้จาก ELISA reader ค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้อาจเนื่องจาก

1) เพลทที่ใช้จับเอนไซม์หรือโปรตีนได้เป็นปริมาณน้อย ประมาณ 300 นาโนกรัม ต่อตารางเซนติเมตร (Deshpande, 1996) เมื่อใส่แอนติเจน (เอนไซม์ HMG-CoA synthase) ลงไป ทั้งไว้ค้างคืนที่ 4 องศาเซลเซียส จึงมีการจับของเอนไซม์กับเพลทได้ต่ำและไม่แตกต่างกัน เมื่อมีแอนติบอดีไปทำปฏิกิริยากับแอนติเจนจึงมีการจับกันอย่างจำเพาะได้น้อย เมื่อใส่แอนติบอดีตัวที่สองและจับสเตรทลงไปทำปฏิกิริยา จึงเกิดสีเข้มน้อย ค่าที่อ่านได้จาก ELISA reader จึงไม่แตกต่างกัน

2) แอนติบอดีที่เตรียมได้ยังอยู่ในลักษณะเป็นแอนตี้ซีรัมที่ไม่ได้แยก โปรตีนอื่นๆ ออก ซึ่งทำให้การเกิดปฏิกิริยาต่างๆเกิดได้น้อยลง

ดังนั้นการประยุกต์ใช้ ELISA ในการตรวจหาปริมาณเอนไซม์ HMG-CoA synthase จึงต้องศึกษาปัจจัยต่างๆเพิ่มขึ้น เช่น ช่วงปริมาณของแอนติเจนที่จะต้องใช้ฉาบเพลทและระยะเวลาการฉาบ

ในการทำ ELISA ในเพลท นอกจากจะมีข้อจำกัดในเรื่องปริมาณโปรตีนที่จับเพลทแล้ว การทำ ELISA ยังมีโปรตีนอื่นๆรวมอยู่ด้วยกัน เช่น โปรตีนอื่นๆในตัวอย่าง และโปรตีนที่ไม่ใช่แอนติบอดีในแอนตี้ซีรัม โปรตีนเหล่านี้อาจทำให้โอกาสที่เอนไซม์ HMG-CoA synthase จะทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีเกิดได้น้อยลง จึงทำให้ค่าที่อ่านต่างจาก Western blot ซึ่งมีการแยกโปรตีนอื่นๆออกไป จึงทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับ HMG-CoA synthase เกิดได้ดีกว่า

4.7 แนวทางในอนาคต

1. สกัดเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่บริสุทธิ์ให้มีความว่องไวของเอนไซม์สูงๆ และมีปริมาณมากพอ เพื่อศึกษาสมบัติต่างๆ เช่น acetoacetyl CoA จะช่วยให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้นจริงหรือไม่

2. เอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่บริสุทธิ์และมีความว่องไวของเอนไซม์สูง จะทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ acetoacetyl CoA thiolase ด้วยเหมือนกับในต้นอ่อนของ หัวผักกาดหนูและแพงพวยบกหรือไม่
3. ศึกษาการเรียงตัวเบสบน cDNA ของ HMG-CoA synthase และสังเคราะห์เอา เปปไทด์ที่เป็นส่วนของ C และ N terminal จากการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่ได้ จาก cDNA ของ HMG-CoA synthase นำไปฉีดกระตุ้นกระต่ายเพื่อให้สร้าง แอนติบอดีและนำแอนติบอดีไปตรวจสอบว่าสามารถทำปฏิกิริยากับ HMG-CoA synthase ที่แยกจากยางพาราได้หรือไม่
4. หาแนวทางการทำ Western blot ไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณโดยหาแนวทาง วัดความเข้มของสีที่ได้จากการทำ Western blot
5. ศึกษาสภาวะเหมาะสมที่ใช้ตรวจหาเอนไซม์ โดยวิธี ELISA เช่น แยกแอนติบอดี ต่อเอนไซม์ออกจากซีรัมของกระต่าย เพื่อใช้ในการหาปริมาณเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ถูกต้องและรวดเร็วขึ้น

5. สรุป

จากการศึกษาเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในน้ำยางพาราพันธุ์ RRIM 600 สามารถสรุปเป็นข้อๆ ได้ดังนี้

1. ได้ทำการแยกเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากซี-ซีรัมของน้ำยางพารา ให้บริสุทธิ์ โดยวิธีโครมาโตกราฟี ทั้งแบบแลกเปลี่ยนประจุ (CM-cellulose) และ เจลฟิลเตรชัน (Sephadex G-75) ตามลำดับ พบว่า มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น ประมาณ 5 เท่า เอนไซม์นี้ยังไม่บริสุทธิ์ ต้องนำไปแยกโดยเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแบบสภาพธรรมชาติ และสกัดเจลออกมา จึงจะได้เอนไซม์ที่ค่อนข้างบริสุทธิ์

2. เอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่แยกได้จากการสกัดเจลและค่อนข้างบริสุทธิ์นี้มีค่า pI = 4.6

3. เมื่อนำเอนไซม์ที่แยกได้ค่อนข้างบริสุทธิ์นี้ ไปหาน้ำหนักโมเลกุล โดยทำ SDS-PAGE เทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่ามีโปรตีน 1 แถบ น้ำหนักโมเลกุล 43,000 ดาลตัน

4. สเปกตรัมของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ค่อนข้างบริสุทธิ์นี้มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ 2 พีค ที่ความยาวคลื่น 229 นาโนเมตร และความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แสดงว่าเอนไซม์นี้มีกรดอะมิโนที่มีอะโรมาติกริง (aromatic ring) อยู่บ้างแต่ไม่มากนัก

5. L-659, 699 ที่ความเข้มข้น 5×10^{-6} M เริ่มมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากซี-ซีรัม ของน้ำยางพารา และ L-659, 699 ที่ความเข้มข้น 10^{-6} M เริ่มมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ได้จากเจลฟิลเตรชัน นอกจากนั้น สารละลาย DMSO 25% (v/v) มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ได้จากเจลฟิลเตรชัน

6. การศึกษาผลของ acetoacetyl CoA ต่อความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ได้จากการสกัดเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแบบสภาพธรรมชาติพบว่า acetoacetyl CoA น่าจะมีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์

7. สามารถเตรียมแอนติบอดีต่อเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่แยกได้
ค่อนข้างบริสุทธิ์ โดยการฉีดเอนไซม์กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีของกระต่าย และ
แอนติบอดีนี้ จะทำปฏิกิริยาแบบจำเพาะต่อเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในตัวอย่าง
ต่างๆได้

8. เมื่อนำแอนติบอดีจากกระต่าย ผสมรวมกับเอนไซม์ HMG-CoA synthase
(แอนติเจน) ที่ได้จากน้ำยาง แอนติบอดีไม่สามารถยับยั้งความว่องไวของเอนไซม์ได้

9. สามารถนำแอนติบอดีจากกระต่าย ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเอนไซม์
HMG-CoA synthase โดยวิธี Western blot ได้ แต่ไม่สามารถนำมาตรวจหาเอนไซม์
โดยวิธี ELISA ให้ได้ผลดีได้ ยังจะต้องศึกษาสภาพที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการตรวจหา
ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

จิรากร โกสัยเสวี และ สุจินต์ แม้นเหมื่อน. 2540. การวิจัยและพัฒนาอาหารในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. วารสารยางพารา. 17(1) : 27 - 29.

ธนาคารกรุงเทพจำกัด (มหาชน). 2540. มูลค่าส่งออกและนำเข้าจำแนกรายสินค้า. วารสารเศรษฐกิจ ธนาคารกรุงเทพ จำกัด (มหาชน). มกราคม 2540 : 38.

วิจิตรา จุติดำรงพันธุ์ และ ผอญุศักดิ์ ครอบงม. 2527. การเปรียบเทียบลักษณะของโปรตีนในน้ำยางพาราพันธุ์ต่างๆ ที่ปลูกในภาคใต้. วารสารสงขลานครินทร์. 6 : 221 - 226.

สถาบันวิจัยยาง. 2540. คำแนะนำพันธุ์ยาง ปี 2540. สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 25 - 26.

สุรีย์ พีรภูติ. 2539. เอนไซม์ไฮดรอกซีเมทิลกลูตาริลโคเอนไซม์เอซิทเอส ในน้ำยางพารา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อุตสาหกรรมภัณฑ์อำไพ. 2527. คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์บางประการของผลผลิตยางไทย 10 พันธุ์ กับ RRIM 600. วารสารสงขลานครินทร์. 6 : 121 - 127.

อรรวดี หาญวิวัฒน์วงศ์. 2536. ปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี. วิทยานิพนธ์กัมกัน. คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 6 - 11

- Adams, S.H., Alho, C.S., Asins, G., Hegardt, F.G. and Marrero, P. F. 1997. Gene expression of mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Co A synthase in a poorly ketogenic mammal : effect of starvation during the neonatal period of the piglet. *Biochem. J.* 324 : 65 - 73.
- Alam, A., Britton, G., Powls, R. and Goach, J. 1991. Aspects related to 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Co A synthesis in higher plants. *Biochem. Soc. Trans.* 19 : 164S - 168S.
- Anderson, L.E. and McClure, W. O. 1973. An improved scintillation cocktail of high solubilizing power. *Anal. Biochem.* 51 : 173 - 179.
- Asins, G., Serra, D., Arias, G. and Hegardt, F.G. 1995. Developmental changes in carnitine palmitoyltransferase I and II gene expression in intestine and liver of suckling rats. *Biochem. J.* 306 : 379 - 384.
- Asins, G., Rosa, J.L., Serra, D., Gil-Gomez, G., Ayte, J., Bartrons, R., Tauler, A. and Hegardt, F.G. 1994. Gene expression of enzymes regulating ketogenesis and fatty acid metabolism in regenerating rat liver. *Biochem. J.* 299 : 65 - 69.
- Ayte, J., Gil - Gomez, G., and Hegardet. F.G. 1993 a. Methylation of the regulatory region of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Co A synthase gene leads to its transcriptional inactivation. *Biochem. J.* 295 : 807 - 812.

- Ayte, J., Gil - Gomez, G., and Hegardt, F.G. 1993 b. Structural characterization of the 3' encoding region of the gene encoding rat mitochondrial 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl coenzyme A synthase. *Gene*. 123 : 267 - 270.
- Ayte, J., Gil - Gomez, G., Haro, D., Marrero, P.F., and Hegardt, F.G. 1990 a. Rat mitochondrial and cytosolic 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - Co A synthases are encoded by two different genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 : 3874 - 3878.
- Ayte, J., Gil-Gomez, G., and Hegardt, F.G. 1990 b. Nucleotide sequence of a rat liver cDNA encoding the cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase. *Nucleic Acids Research*. 18 : 3642 - 3642.
- Asins, G., Rosa, J.L., Serra, D., Gil - Gomez, G., Ayte, J., Bartrons, R., Tauler, A., and Hegardt, F.G. 1994. Gene expression of enzymes regulating ketogenesis and fatty acid metabolism in regenerating rat liver. *Biochem. J.* 299 : 65 - 69.
- Bach, T.J, Weber, T. and Motel, A. 1990. Some properties of enzymes involved in the biosynthesis and metabolism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl - Co A in plants. *Rec. Adv. Phytochem.* 24 : 1 - 82.
- Bach, T.J., Boronat, A., Caelles, C., Ferrer, A., Weber, T., and Wettstein, A. 1991. Aspects related to mevalonate biosynthesis in plants. *Lipids*. 26 : 637 - 648.

- Balasubramanian, S., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. 1977. Regulation of cholesterol synthesis in rat adrenal gland through coordinate control of 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - coenzyme A synthase and reductase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74 (4) : 1421 - 1425.
- Bell, K., Saepudin, E., and Harrison, P. 1996. Irreversible inhibition of 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - coenzyme A synthase from yeast by F - 244 and (RS) β - butyrolactone. Can. J. Chem. 74 : 24 - 27.
- BIO-RAD, Model 111 Mini IEF Cell. Instruction Manual Catalog Numbers 170 - 2975 and 170 - 2976. U.S.A. pp. 6 - 11.
- Buesa, C., Martinez - Gonzalez, J., Casals, N., Haro, D., Piulachs, M - D., Belles, X., and Hegardt, F.G. 1994. *Blattella germanica* has two HMG - Co A synthase genes : both are regulated in the ovary during the gonadotrophic cycle. J. Biol. Chem. 269 (16) : 1177 - 11713.
- Casals, N., Buesa, C., Piulachs, M.D., Cabano, J., Marrero, P. F., Belles, X., and Hegardt, F.G. 1996. Coordinated expression and activity of 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl coenzyme A synthase and reductase in the fat body of *Blattella germanica* during ketogenesis. Insect. Biochem. Mol. Biol. 26 (8-9) : 837 - 843.
- Casals, N., Roca, N., Guerrero, M., Gil - Gomez, G., Jase Ayte, J., Ciudad, C. J. and Hegardt, F.G. 1992. Regulation of the expression of the mitochondrial hydroxy - 3 - methylglutaryl - Co A synthase gene. Biochemical. J. 283 : 261 - 264.

- Chang, T.Y., Limanek, J. S. 1980. Regulation of cytosolic acetoacetyl coenzyme A thiolase, 3 -hydroxy - 3 - methylglutaryl - coenzyme A synthase, 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl coenzyme A reductase, and mevalonate kinase by low density lipoprotein and by 25 - hydroxycholesterol in chinese hamster ovary cells. J. Biol. Chem. 255 (16) : 7787 - 7795.
- Charlier, H.A., Narasimhan, C. and Mizioro, H.M. 1997. Inactivation of 3 - hydroxy 3 - methylglutaryl - Co A synthase and other acyl - Co A. Biochemistry. 36 : 1551 - 1558.
- Chye, M.L., Tan, C.T. and Chua, N.H. 1992. Three genes encode 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl coenzyme A reductase in *Hevea brasiliensis* : hmg 1 and hmg 3 are differentially expressed. Plant Molecular Biology. 19 : 473 - 484.
- Clinkenbeard, K.D., Reed, W.D., Mooney, R.A. and Lane, M.D. 1975 a. Intracellular localization of the 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl coenzyme A cycle enzymes in liver. J. Biol. Chem. 250 : 3108 - 3116.
- Clinkenbeard, K.D., Sugiyama, T., Reed, D.W. and Lane, D.M. 1975 b. Cytoplasmic 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl coenzyme A synthase from liver : purification, properties and role in cholesterol synthesis. J. Biol. Chem. 250 (8) : 3124 - 3135.

- Cullingford, T.D., Dophin, C.T., Bhakoo, K.K., Peuchen, S., Canevari, L. and Clark, J. B. 1998. Molecular cloning of rat mitochondrial 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - Co A lyase and detection of the corresponding mRNA and of those encoding 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - Co A cycle in central nervous system of suckling rat. *Biochem. J.* 329 : 373 - 381.
- Deshpande, S.S. 1996. *Enzyme Immuno Assay from Concept to Product Development.* I de Tek Inc Chapman and Hall.
- Dooley, K.A., Millinder, S. and Osborne, T.F. 1998. Sterol regulation of 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - coenzyme A synthase gene through a direct interaction between sterol regulatory element binding protein and the trimeric CCAAT - binding factor / nuclear factor Y. *J. Biol. Chem.* 273 (3) : 1349 - 1356.
- Duce, H., Pegorier, J.P, Quant, P.A., Herbin, C., Kohl, C., and Girard, J. 1994. Hepatic ketogenesis in newborn pigs is limited by low mitochondrial 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - Co A synthase activity. *Biochem. J.* 298 : 207 - 212.
- Edwards, P.A. 1986. Regulation of rat liver 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl coenzyme A synthase and the chromosomal localization of the human gene. *J. Biol. Chem.* 261 (34) : 16249 - 16255.
- Engvall, E. 1980. Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. *Method Enzymol.* 70 : 419 - 439.

- Gibbons, G.F. and Pullinger, C.R. 1987. Regulation of hepatic very - low - density lipoprotein secretion in rats fed on a diet high in unsaturated fat. *Biochem. J.* 243 : 487 - 492.
- Gil, G., Goldstein, J.L., Slaughter, C.A. and Brown, M.S. 1986. Cytoplasmic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase from the hamster isolation and sequencing of a full-length cDNA. *J. Biol. Chem.* 261 (8) : 3710 - 3716.
- Gil - Gomez, G., Ayte, J. and Hegardt, F.G. 1993. The rat mitochondrial 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - coenzyme A - synthase gene contains elements that mediate its multihormonal regulation and tissue specificity. *Eur. J. Biochem.* 213 : 773 - 779.
- Goldstein, J.L. and Brown, M.S. 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* 343 (6257) : 425 - 430.
- Gondet, L., Weber, T., Maillot - Vernier, P., Benveniste, P. and Bach, T.J. 1992. Regulatory role of microsomal 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl coenzyme A reductase in a tobacco mutant that over produces sterols. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 186 (2) : 888 - 893.
- Greenspan, M.D., Bull, H.G., Yjdkovitz, J. B., Hanf, D.P. and Alberts, A.W. 1993. Inhibition of 3 - hydroxy 3 - methylglutaryl Co A synthase and cholesterol biosynthesis by β - lactone inhibitors and binding of these inhibitors to the enzyme. *Biochem. J.* 289 : 889 - 895.

- Greenspan, M.D., Yudkovitz, J.B., Lo, C.Y.L., Chen, J.S., Alberts, A.W.,
Hunt, V.M., Chang, M.N., Yang, S.S., Thompson K.L., Chiang,
Y.C.P., Chabala, J.C., Monaghan, R.L., and Schwartz, R.L. 1987. In
hibition of hydroxy methylglutaryl coenzyme A synthase by L-659, 699.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84 : 7488 - 7492.
- Hepper, C.M. and Audley, B.G. 1969. The biosynthesis of rubber from β -
Hydroxy - β - methylglutaryl coenzyme A in *Hevea brasiliensis* latex
Biochem. J. 114 : 379 - 386.
- Katayama, S., Adachi, N., Takao, K., Nakagawa, T., Matsuda, H. and
Kawamukai. 1995. Molecular Cloning and sequencing of the hcs gene,
which encodes 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl coenzyme A synthase of
Schizosaccharomyces pombe. Yeast. 11 : 1533 - 1537.
- Kush, A., Goyvaents, E., Chye, M.L. and Chua, N.H. 1990. Laticifer specific
gene expression in *Hevea brasiliensis* (rubber tree). Proc. Natl. Acad.
Sci. U.S.A. 87 : 1787 - 1790.
- Laemmli, U.K. and Favre, M. 1973. Maturation of the head of bacteriophage 4 : I
DNA packaging events. J. Mol. Biol. 80 : 575 - 599.
- Leonard, S., Arbogast, D., Geyer, D., Jones, C. and Sinensky, M. 1986.
Localization of the gene encoding 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl -
coenzyme A synthase to human chromosome 5. Proc. Natl. Acad. Sci.
U.S.A. 83 : 2187 - 2189.

- Lowe, D.M., and Tubbs, P.K. 1985. Succinylation and inactivation of 3 - hydroxy 3 - methylglutaryl - Co A synthase by succinyl - Co A and its possible relevance to the control of ketogenesis. *Biochem. J.* 232 : 37 - 42.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with folin- phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265 - 275.
- Lynen, F. 1969. Biochemical problems of rubber synthesis. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya.* 21 (4) : 389 - 406.
- Martinez - Gonzalez, J., Buesa, C., Piulachs, M.D., Belles, X. and Hegardt, F. G. 1993. 3 - Hydroxy - 3 - methylglutaryl expression, developmental pattern and tissue expression. *Eur. J. Biochem.* 217 : 691 - 699.
- Mascaro, C., Buesa, C., Ortiz, J.A., Haro, D. and Hegardt, F.G. 1995. Molecular cloning and tissue expression of human mitochondrial 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - coenzyme A synthase. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 317 (2) : 385 - 390.
- Mayer, R.J., Louis - Flamberg, P., Elliott, J.D., Fisher, M. and Leber, J. 1990. Inhibition of 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl coenzyme A synthase by antibiotic 1233 A and other β - lactones. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 169 (2) : 610 - 616.

- Mehrabian, M., Callaway, K.A., Clarke, C.E., Tanaka, R.D., Greenspan, M., Lusic, A.J., Sparkes, R.S., Mohandas, T., Edmond, J., Fogelman, A.M. and Edwards, P.E. 1986. Regulation of rat liver 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - coenzyme A synthase and the chromosomal localization of the human gene. *J. Biol. Chem.* 261 : 16249 - 16255.
- Mehrabian, M., Callaway, K.A., Clarke, C.F., Tanaka, R.D., Greenspan, M., Lusic, A.J., Sparkes, R.S., Mohandas, T., Edmond, J., Fogelman, A.M. and Robin, S.P. and Michael, S. 1987. Characterization of HMG - Co A synthase activity of rat liver and CHO - K1 cells. *J. Cell. Biochem.* 35 : 93 - 103.
- Misra, I., and Miziorko, H.M. 1996. Evidence for the interaction of avian 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - Co A synthase histidine 264 with acetoacetyl - Co A. *Biochemistry.* 35 : 9610 - 9616.
- Miziorko, H.M. 1985. 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - coenzyme A synthase from chicken liver. *Methods Enzymol.* 110 : 19 - 26.
- Miziorko, H.M. and Behnke, C.E. 1985 a. Active - Site - Directed inhibition of 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl coenzyme A synthase by 3 - chloropropinyl coenzyme A. *Biochemistry.* 24 : 3174 - 3179.
- Miziorko, H.M. Behnke, C.E. 1985 b. Amino acid sequence of an active site peptide of avian liver mitochondrial 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl Co A synthase. *J. Biol. Chem.* 260 (25) : 13513 - 13516.

- Miziorko, H.M., Clinkenbeard, K.D., Reed, W.D. and Lane, M.D. 1975. 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A synthase : evidence for an acetyl-S-enzyme intermediate and identification of a cysteinyl sulfhydryl as the site of acetylation. *J. Biol. Chem.* 250 (5) : 5768 - 5773.
- Miziorko, H.M. and Lane M.D. 1977. 3-hydroxy-3-methylglutaryl Co A synthase : participation of acetyl-S-enzyme and enzyme-S-hydroxymethylglutaryl-S Co A intermediates in the reaction. *J. Biol. Chem.* 252 (4) : 1414 - 1420.
- Nagashima, H., Kumagai, H., Tomoda, H., and Omura, S. 1993. Inhibition of hepatic cholesterol biosynthesis by a 3-hydroxyl-3-methylglutaryl coenzyme A synthase inhibitor, 1233 A, in mice. *Life sciences.* 52 : 1595 - 1600.
- Ortiz, J.A., Gil-Gomez, G., Casaroli-Marano, R.P., Vilaro, S., Hegard, F.G. and Haro, D. 1994. Transfection of the ketogenic mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase cDNA into Mev-1 cells corrects their auxotrophy for mevalonate. *J. Biol. Chem.* 269 (46) : 28523 - 28526.
- Patel, T.B., and Clark, J.B. 1978. Acetoacetate metabolism in rat brain : development of acetoacetyl-coenzyme A deacylase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase. *Biochem. J.* 1760 : 951 - 958.

- Prip - Buus, C., Thumelin, S., Chatelain, F., Pegorier, J. P. and Girard, J. 1995. Hormonal and nutritional control of liver fatty acid oxidation and ketogenesis during development. *Biochem. Soc. Trans.* 23 : 2190 - 2195.
- Quant, P., Tubbs, P.K. and Brand, M.D. 1987. 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl coenzyme A synthase activity in rat liver increases with increased ketogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* 15 : 1068 - 1069.
- Quant, P.A., Tubbs, P.K. and Brand, M.D. 1989. Treatment of rat with glucagon or mannoheptulose increases mitochondrial 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - Co A synthase activity and decreases succinyl - Co A content in liver. *Biochem. J.* 262 : 159 - 164.
- Reed, D.W., Clinkenbeard, K.D. and Lane, D.M. 1975. Molecular and catalytic properties of mitochondrial (ketogenic) 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl coenzyme A synthase of liver. *J. Biol. Chem.* 250 (8) : 3117 - 3123.
- Rosser, D.S.E., Ashby, M.N., Ellis, J.L. and Edwards, P.A. 1989. Coordinate regulation of 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl coenzyme A synthase, 3 - hydroxy 3 - methylglutaryl coenzyme A reductase, and prenyltransferase synthesis but no degradation in Hep G2. *Cells. J. Biol. Chem.* 264 : 12653.

- Royo, T., Ayte, J., Albericio, F., Giralt, E., Haro, D. and Hegardt, F.G. 1991. Diurnal rhythm of rat liver cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase. *Biochem. J.* 280 : 61 - 64.
- Royo, T., Pedragosa, M.J., Ayte, J., Gil-Gonzalez, G., Vilaro, S. and Hegardt, F. G. 1993. Testis and ovary express the gene for the ketogenic mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase. *J. Lipid. Res.* 34 : 867 - 874
- Royo, T., Pedragosa, M.J., Ayte, J., Gil-Gomez, G., Vilaro, S. and Hegardt, F.G. 1995. Immunolocalization of mitochondrial HMG-CoA synthase in rat liver. *J. Cellular. Physiology.* 162 : 103 - 109.
- Salam, W.H., Cagen, L.M. and Heimberg, M. 1988. Regulation of hepatic cholesterol biosynthesis by fatty acid : effect of feeding olive oil on cytoplasmic acetoacetyl coenzyme A thiolase beta-hydroxy-beta-methylglutaryl-CoA synthase and acetoacetyl coenzyme A ligase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153 (1) : 422 - 427.
- Schnitzer, P.R. and Sinensky, M. 1987. Characterization of HMG-CoA synthase activity of rat liver and CHO-KI cells. *J. Cell. Biochem.* 35 (2) : 93 - 103.
- Serra, D., Asins, G. and Hegardt, F. G. 1993. Ketogenic mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene expression in intestine and liver of suckling rats. *Arch. Biochem. And Biophysics.* 301 (2) : 445 - 448.

- Serra, D., Casals, N., Asins, G., Royo, T., Ciudad, C. J. and Hegardt, F.G. 1993. Regulation of mitochondrial 3 - Hydroxy - 3 - methylglutaryl - coenzyme A synthase protein by starvation, fat feeding, and diabetes. Arch. Biochem. And Biophys. 307 (1) : 40 - 45.
- Serra, D., Fillat, C., Matas, R., Boseh, F. and Hegardt, F.G. 1996. Tissue - specific expression and dietary regulation of chimeric mitochondrial HMG - Co A synthase / human growth hormone gene in transgenic mice. J. Biol. Chem. 271 (13) : 7529 - 7534.
- Shah, S.N. 1982. Cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase E. C. 4.1.3.5 in rat brain properties developmental change. Neurochem. Res. 7 : 1359 - 1366.
- Siess, E.A., Fahimi, F.M. and Wieland, O.H. 1980. Decrease by glucagon in hepatic succinyl - Co A Biochemical And Biophys. Res. Commun. 95 (1) : 205 - 211.
- Sipat, A.B. 1982. Hydroxymethylglutaryl - Co A reductase (NADPH) in the latex of *Hevea brasiliensis*. Phytochemistry. 21 : 2613 - 2618.
- Smith, J.R., Osborne, T.F., Slaughter, C.A., Brown, M.S., Goldstein, J. and Gil, G.L. 1988. Multiple sterol regulatory elements in promoter for hamster 3 - hydroxy - 3 -methylglutaryl - coenzyme A synthase . J. Biol. Chem. 263 : 18480 - 18487.

- Suvachittanont, W., Promsuwansiri, C. and Trankanont, K. 1986. Levels of thiol compounds in leaves *Hevea brasiliensis*. Proc. of Australian Biochem. Soc. P90.
- Suvachittanont, W., and Wititsuwannakul, R. 1995. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase in *Hevea brasiliensis*. Phytochemistry. 40 : 757 - 761.
- Thumelin, S., Forestier, M., Girard, J. and Pegorier, J.P. 1993. Developmental changes in mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Co A synthase gene expression in rat liver, intestine and kidney. Biochem. J. 292 : 493 - 496.
- Tomoda, H., Kumagai, H., Ogawa, Y., Sunazuka, T., Hashizume, H., Nagashima, H. and Omura, S. 1997. Synthesis of four chiral isomers of β -lactone DU-6622 and inhibition of HMG-Co A synthase by the specific (2R,3R)-isomer. J. Org. Chem. 62 : 2161 - 2165.
- Tomoda, J., Kumagai, J., Tanaka, J. and Omura, S. 1987. F-244 specifically inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase. Biochem. Biophys. Acta. 922 (3) : 351 - 356.
- Topping, D.L. and Mayes, P.A. 1982. Insulin and non-esterified fatty acids. Biochem. J. 204 : 433 - 439.

- Van der Heijden, R., Verpoorate, R. and Duine, J.A. 1994. Biosynthesis of 3S - hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A in *Catharanthus roseus* : acetoacetyl-Co A thiolase and HMG-Co A synthase show similar chromatographic behaviour. *Plant Physiol. Biochem.* 32 (6) : 807 - 812.
- Voller, A., Bidwell, D.E. and Bartlett, A. 1976. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. *WHO. Bull.* 53 : 55 - 65.
- Weber, T. and Bach, T.J. 1993. Partial purification and characterization of membrane associated 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase from radish seedling. *J. Naturforsch.* 48 C : 444 - 450.
- Weber, T. and Bach, T.J. 1994. Conversion of acetyl coenzyme A into 3-hydroxy -3- methylglutaryl coenzyme A in radish seedling evidence of a single monomeric protein catalyzing a Fe^{2+} /quinone - stimulated double condensation reaction. *Biochem. Biophys. Acta.* 1211 : 85 - 96.
- Williamson, D.H., Bates, M.W., Krebs, H.A. 1968. Activity and intracellular distribution of enzymes of ketone body metabolism in rat liver. *Biochem. J.* 108 : 353 - 361.
- Wititsuwannakul, R., Wititsuwannakul, D. and Suwanmanee, P. 1990. 3 - hydroxy - 3 -methylglutaryl - coenzyme A reductase from the latex of *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry.* 29 : 1401 - 1403.

Wititsuwannakul, R. 1986. Diurnal variation of HMG - CoA reductase in latex of *Hevea brasiliensis*. *Experientia*. 42 : 45 - 46.

Wititsuwannakul, R., Witisuwannakul, D., Sotthibandhu, R., Suvachittanont, W. and Sukonrat, W. 1988. Correlation studies on 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl coenzyme A reductase and dry rubber yield in *Hevea brasiliensis*. Proc. IRRDB. Rubber Phys. And Exp. Meeting, Paris, France. 161.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวนงเยาว์ เทพยา	
วัน เดือน ปี เกิด	23 มกราคม 2515	
วุฒิทางการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2536